



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Origen y Evolución del Metabolismo de Lípidos en Arqueas

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Biología Experimental)

P R E S E N T A:

Daniel Dario Ortiz Aldana

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Arturo Carlos Il Becerra Bracho
Facultad de Ciencias

COMITÉ TUTOR: Dr. Luis Felipe Jiménez García
Facultad de Ciencias
Dr. León Patricio Martínez Castilla
Facultad de Química

MÉXICO, D.F.

Marzo de 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/098/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de mayo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **ORTIZ ALDANA DANIEL DARÍO** con número de cuenta **510020091** con la tesis titulada "**Origen y Evolución del Metabolismo de Lípidos en Arqueas**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO**:

Presidente: DR. ANTONIO EUSEBIO LAZCANO-ARAUJO REYES
Vocal: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
Secretario: DR. RUBÉN GERARDO CONTRERAS PATIÑO
Suplente: DR. LUIS JOSÉ DELAYE ARREDONDO
Suplente: DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 05 de marzo de 2013.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
Coordinadora del Programa

Agradecimientos

Primero quiero extender el debido reconocimiento a las Instituciones Públicas que respaldaron este trabajo. Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México la excelente calidad de sus servicios educativos y el estímulo económico que me concedió para asistir al congreso internacional de origen de la vida. Y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el financiamiento otorgado al Dr. Arturo Becerra (proyecto 100199) y la beca (239904) que me suministró para cursar mi maestría.

Doy las gracias a mi tutor, el Dr. Arturo Becerra, y a los miembros de mi comité tutorial, los Doctores León P. Martínez Castilla y Luis F. Jiménez García, por su activa participación durante el desarrollo de mi investigación. También agradezco a mis sinodales, los Doctores Antonio Lazcano, Luis Delaye, Diego G. Halphen, Gerardo Contreras y Enrique Merino, su buena disposición y valiosos comentarios.

Es importante mencionar en esta sección a aquellos que sin ninguna obligación contribuyeron para hacer de este un mejor trabajo. El análisis y el manejo de datos hubiera sido imposible sin el soporte técnico del MC. Ricardo Hernández y la LI. Heladia Salgado. Por otro lado, Las imágenes que facilitan la comprensión de este texto fueron elaboradas por la MC. Ariadna Morales. Y la MC. Sara Islas me ayudó a conseguir publicaciones que no estaban disponibles en línea.

Índice General

Resumen

Abstract

| | |
|---|-----------|
| I. Introducción | 1 |
| 1.1 Biología de las Arqueas | 1 |
| 1.2 Evolución del Metabolismo de Lípidos | 2 |
| 1.2.1 Lípidos y su Función Biológica | 2 |
| 1.2.2 Las Membranas Celulares Contemporáneas | 2 |
| 1.2.3 Biosíntesis de Isoprenoides | 3 |
| 1.2.4 Biosíntesis de Ácidos Grasos | 5 |
| 1.2.5 Biosíntesis de Triacilgliceroles | 5 |
| 1.2.6 Segundos Mensajeros Lipídicos | 7 |
| 1.2.6.1 Biosíntesis de Fosfoinosítidos | 7 |
| 1.2.6.2 Biosíntesis de Esteroles | 7 |
| 1.2.6.3 Biosíntesis de Esfingolípidos | 8 |
| II. Objetivos | 9 |
| III. Metodología | 9 |
| IV. Resultados | 10 |
| 4.1 Biosíntesis de Ácidos Grasos y Fosfolípidos | 10 |
| 4.2 Biosíntesis de Triacilgliceroles | 15 |
| 4.3 Biosíntesis de Terpenoides Policíclicos | 15 |
| 4.4 Biosíntesis de Esfingolípidos | 16 |
| V. Discusión | 16 |
| 5.1 Biosíntesis de Fosfoglicerolípidos de Naturaleza Bacteriana/Eucarionte en Arqueas | 16 |
| 5.1.1 Biosíntesis de Glicerol-3-Fosfato | 17 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 5.1.2 | Biosíntesis de Ácidos Grasos | 17 |
| 5.1.3 | Aciltransferasas | 23 |
| 5.2 | Naturaleza de la Membrana del Último Ancestro Común | 23 |
| 5.3 | Almacenaje de Energía | 25 |
| 5.4 | Segundos Mensajeros Lipídicos | 25 |
| VI. | Conclusiones | 26 |
| VII. | Referencias | 26 |
| Anexos | | 36 |

Índice de Anexos

1. Reconstrucción de Caracteres Ancestrales

| | |
|----------------------------------|----|
| 1a. Glicerol Cinasa | 36 |
| 1b. Serina Palmitoil Transferasa | 37 |
| 1c. 1-Fosfato Liasa | 38 |

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Representación gráfica de la presencia y la ausencia de las enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos tipo II en los genomas de arqueas. *glp*, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; *glpK*, glicerol cinasa; *acpP*, proteína acarreadora de acilos; *acpS*, ACP sintasa; *accC*, biotina carboxilasa; *accB*, proteína acarreadora de biotina carboxilada; *accA*, carboxiltransferasa subunidad α ; *accD*, carboxiltransferasa subunidad β ; *fabD*, malonil-CoA:ACP transacilasa; *fabH*, β -cetoacil-ACP sintasa III; *fabG*, β -cetoacil-ACP reductasa; *fabZ*, β -hidroxiacil-ACP deshidratasa; *fabA*, β -hidroxidecanoil-ACP deshidratasa; *fabI*, enoil-ACP reductasa I; *fabK*, enoil-ACP reductasa II; *fabL*, enoil-ACP reductasa III; *fabB*, β -cetoacil-ACP sintasa I; *fabF*, β -cetoacil-ACP sintasa II. **11**

Cuadro 2. Representación gráfica de la presencia y la ausencia de las enzimas involucradas en la biosíntesis de glicerolípidos en los genomas de arqueas. *plsX*, acil-ACP:fosfato transacilasa; *plsY*, *sn*-glicerol-3-fosfato aciltransferasa; *plsB*, *sn*-glicerol-3-fosfato aciltransferasa; *plsC*, 1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfato aciltransferasa; *cdsA*, citidin-difosfato-diglicérido sintasa; GNPAT, dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa; GPAT 1-2, glicerol-3-fosfato aciltransferasa 1-2; GPAT 3-4, glicerol-3-fosfato aciltransferasa 3-4; GAT, glicerol-3-fosfato/dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa; ATS1, glicerol-3-fosfato aciltransferasa; GPAT, glicerol-3-fosfato aciltransferasa; AGPAT 1-2, acil-CoA:1-acilglicerol-*sn*-3-fosfato aciltransferasa α - β ; AGPAT 3-4, acil-CoA:1-acilglicerol-*sn*-3-fosfato aciltransferasa γ - δ ; LPAAT, lisocardiolipina/lisofosfolípido aciltransferasa; MBOAT, *O*-aciltransferasa acoplada a membrana 1-2; LPAAT, lisofosfolípido aciltransferasa; TGL4, triacilglicerol lipasa/esteril ester hidrolasa/fosfolipasa A2/lisofosfatidato aciltransferasa; PPAP2, fosfatidato fosfatasa. **12**

Cuadro 3. Representación gráfica de la presencia y la ausencia de las enzimas involucradas en la síntesis de lípidos polares en los genomas de arqueas. PSS, fosfatidilserina sintasa; PSD, fosfatidilserina descarboxilasa; PEMT, fosfatidiletanolamina *N*-metiltransferasa; PEMMT, fosfatidil-*N*-metiletanolamina *N*-metiltransferasa; PLA2G, fosfolipasa A; PLB, fosfolipasa A; TGL4, fosfolipasa A; PCS, fosfatidilcolina sintasa. **14**

Cuadro 4. Representación gráfica de la presencia y la ausencia de las enzimas involucradas en la síntesis de triglicéridos en los genomas de arqueas. WS/DGAT, cera sintasa/acil-CoA:diacilglicerol

aciltransferasa; DGAT, diacilglicerol aciltransferasa; PDAT, fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa; DGAT 1, diacilglicerol aciltransferasa 1; DGAT 2, diacilglicerol aciltransferasa 2. **15**

Cuadro 5. Representación gráfica de la presencia y la ausencia de las enzimas involucradas en la síntesis de terpenoides policíclicos en los genomas de arqueas. **15**

Cuadro 6. Representación gráfica de la presencia y la ausencia de las enzimas involucradas en la síntesis de esfingolípidos en los genomas de arqueas. SPT, serina palmitoil transferasa; 3KSR, 3-cetoesfingianina reductasa; SK, esfingosina cinasa; SPP, esfingosina 1-fosfato fosfatasa; SPL, esfingosina 1-fosfato liasa; DHCerS dihidroceramida sintasa; DHCerD, dihidroceramida reductasa; CGalT, uridín difosfato-galactosa ceramida galactosiltransferasa; SMS, esfingomielina sintasa; GlcCerS, glucosilceramida sintasa. **16**

Cuadro 7. Dominios proteínicos que integran la subunidad BC de las enzimas acetil-CoA carboxilasa, piruvato carboxilasa y propionil carboxilasa. **18**

Cuadro 8. Distribución de las β -cetoacil-ACP sintasas en el dominio Archaea. **20**

Cuadro 9. Dominios proteínicos que integran las enzimas β -cetoacil-ACP sintasa I, II y III. **21**

Cuadro 10. Dominios proteínicos que integran las enzimas β -cetoacil-ACP reductasa y enoil-reductasas I, II y III. **22**

Cuadro 11. Coenzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos e isoprenoides. **24**

Índice de Figuras

Figura 1. Diferencias bioquímicas entre los lípidos de la membrana de arqueas, bacterias y eucariontes. **3**

Figura 2. Ruta del mevalonato de arqueas y eucariontes. AACT, acetoacetyl-CoA tiolasa; HMGS, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa; HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; MVK, mevalonato cinasa; PMK, fosfomevalonato cinasa; MDC, difosfomevalonato descarboxilasa; IDI, isopentenil difosfato isomerasa. **4**

Figura 3. Biosíntesis de ácidos grasos II. AccC, biotina carboxilasa; AccB, proteína acarreadora de biotina carboxilada; AccA, carboxiltransferasa subunidad α ; AccD, carboxiltransferasa subunidad β ; ACP, proteína acarreadora de acilos; FabD, malonil-CoA:ACP transacilasa; FabH, β -cetoacil-ACP sintasa III; FabB, β -cetoacil-ACP sintasa I; FabF, β -cetoacil-ACP sintasa II; FabG, β -cetoacil-ACP reductasa; FabZ, β -hidroxiacil-ACP deshidratasa; FabA, β -hidroxidecanoil-ACP deshidratasa; FabI, enoil-ACP reductasa I; FabK, enoil-ACP reductasa II; FabL, enoil-ACP reductasa III. **5**

Figura 4. Biosíntesis de Triacilgliceroles. A) Ruta eucarionte. GPAT, glicerol-fosfato aciltransferasa; AGPAT, acil-glicerol-fosfato aciltransferasa; PAP, ácido fosfatídico fosfohidrolasa; MGAT, acil-CoA:monoacilglicerol aciltransferasa; DGAT, acil-CoA:diacilglicerol acil-transferasa; PDAT, fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa. B) Ruta bacteriana. **7**

Figura 5. Biosíntesis de terpenoides policíclicos. SHC, escualeno-hopeno ciclasa; OSC óxido-escualeno ciclasa. **8**

Figura 6. Biosíntesis de esfingolípidos. **9**

Figura 7. Biosíntesis de lípidos polares. G3PDH, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; G1PDH, glicerol-1-fosfato deshidrogenasa; G3P, glicerol-3-fosfato; G1P, glicerol-1-fosfato; GGGP, 3-*O*-geranilgeranil-*sn*-glicerol fosfato; GGGPS, GGGP sintasa; PA, ácido fosfatídico; DGGGP, 2,3-di-*O*-geranilgeranil-*sn*-glicerol-fosfato; DGGGPS, DGGGP sintasa; CDP citidín difosfato; PCS, fosfatidilcolina sintasa; PSS, fosfatidilserina sintasa; PGS, fosfatidilglicerol sintasa; PIS; fosfatidilinositol sintasa; ASS, arquetidilserina sintasa; AGS, arquetidilglicerol sintasa; AIS, arquetidilinositol sintasa; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; AS, arquetidilserina; PGP, fosfatidilglicerolfosfato; AGP, arquetidilglicerolfosfato; PI fosfatidilinositol; AS, arquetidilinositol; PSD fosfatidilserina descarboxilasa; PGPP, fosfatidilglicerolfosfato fosfatasa; ASD, arquetidilserina descarboxilasa; PE, fosfatidiletanolamina; AE, arquetidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; AG, arquetidilglicerol. **13**

Figura 8. Análisis filogenético de la subunidad BC. En anaranjado la subunidad BC de la acetil-/propionil-CoA carboxilasa (K11263); en verde la subunidad BC de la acetil-CoA/propionil-CoA carboxilasa (K01964); en azul la subunidad BC de la piruvato carboxilasa (K01959); en rojo la subunidad BC de la acetil-CoA carboxilasa (K01961); en gris la subunidad BC de la propionil-CoA carboxilasa (K01965); y en negro la subunidad BC de la carbamoil-fosfato sintasa (K01955). El color de las ramas indica la procedencia de las secuencias: verde para bacterias, azul para euriarqueotas, rosa para crenarqueotas y morado para thaumarqueotas. **19**

Figura 9. Análisis filogenético de la β -cetoacil-ACP sintasa III. En rojo las secuencias que contienen los dominios proteínicos ACP_syn_III y ACP_syn_III C y en naranja las secuencias las secuencias que contienen los dominios proteínicos HMG_CoA_synt_N y ACP_syn_III_C. **21**

Resumen

El papel biológico de los lípidos en las arqueas no es claro. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es proporcionar un panorama general del metabolismo de lípidos en estos organismos usando un enfoque filogenómico y distintos métodos de reconstrucción ancestral de caracteres. Nuestros resultados indican que algunas arqueas podrían ser capaces de sintetizar los componentes esenciales de los fosfoglicerolípidos de naturaleza bacteriana. Sin embargo, las aciltransferasas que unen el glicerol-3-fosfato y los ácidos grasos están ausentes en este grupo. El análisis bioquímico sugiere que la biosíntesis de isoprenoides precedió la biosíntesis de ácidos grasos. No obstante, no fue posible determinar si la membrana celular del cen ancestro estaba compuesta por isoprenoides o ácidos grasos, dado que ambos tipos de lípidos probablemente estuvieron presentes cuando esta entidad biológica apareció. Nuestros datos también muestran que las enzimas que participan exclusivamente en la síntesis de triglicéridos están ausentes en arquea. De esta manera, el almacenaje de energía debió surgir en bacterias como otros autores han sugerido. No se encontró evidencia que respalde el papel de los fosfoinosítidos, terpenoides policíclicos y esfingolípidos como moléculas de señalización.

Abstract

The biological role of lipid molecules in archaeal species remains poorly understood. Thus, our goal is to provide insight into archaeal lipid metabolism using a phylogenomic approach and different ancestral state reconstruction methods. Our results show that some archaea might be capable of synthesizing the main building blocks of bacterial-like glycerolipids. However, the acyltransferases that link together glycerol-3-phosphate and fatty acids are missing in this group. The biochemical analysis suggests that isoprenoid biosynthesis preceded the biosynthesis of fatty acids. However, it was not possible to determine whether the cell membrane of the cenancestor was made of isoprenoids or whether it was made of fatty acids, because both kinds of lipids probably were available at the time this biological entity appeared. Our data also show that the enzymes that exclusively participate in triglyceride synthesis are absent in archaea. Thus, energy storage first appeared in bacteria as other authors have proposed. We did not find any evidence that supports the role of phosphoinositides, cyclic triterpenoids and sphingolipids as signaling molecules.

I. Introducción

1.1 Biología de las Arqueas

El dominio celular Archaea es un grupo monofilético de procariontes con una historia evolutiva independiente de las bacterias. Su estatus taxonómico se sustenta principalmente en: (i) el análisis filogenético de secuencias de rRNA (Woese y Fox 1977); (ii) la distintiva composición lipídica de su membrana celular (Tornabene y Langworthy 1979), (iii) la ausencia de mureína en su pared celular (Kandler y König 1998) y (iv) las diferencias entre la maquinaria de replicación y transcripción de arqueas y bacterias (Werner 2007). La clasificación taxonómica actual de este grupo está basada en el análisis filogenético de rRNA y proteínas ribosomales y oficialmente reconoce cuatro phyla: Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota y Thaumarchaeota (Pester, Schleper y Vagner 2011; Brochier-Armanet, Gribaldo y Fortere 2012).

Las filogenias de la H⁺-ATPasa (Gogarten *et al.* 1989; Iwabe *et al.* 1989), de los factores de elongación Tu y G (Iwabe *et al.* 1989), de la aminoacil-tRNA sintetasa (Brown y Doolittle 1995), de la carbamoilfosfato sintetasa (Lawson, Charlebois y Dillon 1996), de la partícula de reconocimiento de señal (SRP) y del receptor de la SRP (Gribaldo y Cammarano 1998) apoyan la hipótesis de una divergencia temprana entre bacterias y arqueas a partir de un último ancestro común (Woese y Fox 1977; Woese, Kandler y Wheelis 1990; Woese 1998; Graham *et al.* 2000). Una hipótesis alternativa sugiere que las arqueas se originaron recientemente a partir de un ancestro eubacteriano como consecuencia de una rápida adaptación secundaria a la hipertermofilia (Cavalier-Smith 2002). Aunque el registro fósil parece apoyar el origen reciente de las arqueas (Chappe, Albrecht y Michaelis 1982), la adaptación a la hipertermofilia no es suficiente para explicar las diferencias en el aparato de replicación de las arqueas, ni la sustitución del G3P por G1P en los lípidos de la membrana de estos organismos (Gribaldo y Brochier-Armanet 2006).

Las arqueas ocupan una gran variedad de nichos ecológicos (Keough, Schmidt y Hicks 2003; Galand *et al.* 2005; Kim *et al.* 2005; Knittel *et al.* 2005), pero se les ha asociado a los ambientes más extremos de nuestro planeta. Estos organismos se han establecido con éxito en el subsuelo del lecho marino (Jørgensen y D'Hondt 2006), en chimeneas hidrotermales (Takai y Horikoshi 1999), manantiales sulfurosos (Skirnisdottir *et al.* 2000), lagunas con temperatura superior a los 100° C (Barns *et al.* 1994; Hobel *et al.* 2005), estanques o mares hipersalinos (Oren *et al.* 1990, 1995) y glaciares (Murray *et al.* 1998). Las arqueas se han adaptado para sobrevivir simultáneamente condiciones de estrés energético crónico y de temperatura y pH extremos (Kaneshiro y Clark 1995; DeLong 2000; Fütterer 2004; Cavicchioli 2006; Valentine 2007).

1.2 Evolución del Metabolismo de Lípidos

1.2.1 Lípidos y su Función Biológica

Los lípidos son moléculas anfifílicas solubles en solventes orgánicos, pero no en agua. Sus funciones biológicas más reconocidas incluyen: (1) su papel como componentes estructurales de las membranas biológicas, (2) el almacenaje de energía y (3) su rol como moléculas de señalización (van Meer, Voelker y Feigenson 2008).

1.2.2 Las Membranas Celulares Contemporáneas

La membrana celular es la estructura biológica que separa el interior de las células del medio circundante y que permite el transporte selectivo de iones y moléculas entre ambos espacios. La composición bioquímica de esta estructura es notablemente distinta entre arqueas, bacterias y eucariontes; las principales diferencias, según Peretó, Lopez-García y Moreira (2004), son: (i) las cadenas alifáticas de los fosfolípidos que integran la membrana celular de las arqueas están compuestas por isoprenoides, mientras que las cadenas alifáticas de los fosfolípidos que integran la membrana celular de las bacterias y los eucariontes están compuestas por ácidos grasos. (ii) Las cadenas alifáticas de los fosfolípidos de las arqueas se unen al isómero glicerol-1-fosfato (G1P), pero las cadenas alifáticas de los fosfolípidos de las bacterias y los eucariontes se unen al glicerol-3-fosfato (G3P). (iii) Las cadenas alifáticas se unen al glicerol fosfato a través de un enlace éter en arqueas y mediante un enlace éster en bacterias y eucariontes. La diferencia más importante es la estereoquímica del glicerol-fosfato, dado que no existe reporte de excepción alguna. No obstante, se desconoce la razón de esta preferencia. Se ha atribuido a la inestabilidad de las membranas heteroquirales dicha diferenciación (Koga *et al.* 1998; Wächtershäuser 2003). Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de ambos enantiómeros son equivalentes (Koga y Morii 2007), Incluso se ha demostrado que la estabilidad de las membranas heteroquirales es igual o mayor que la de las membranas homoquirales (Shimada y Yamagishi 2011). Por lo tanto, la razón de esta preferencia todavía es desconocida.

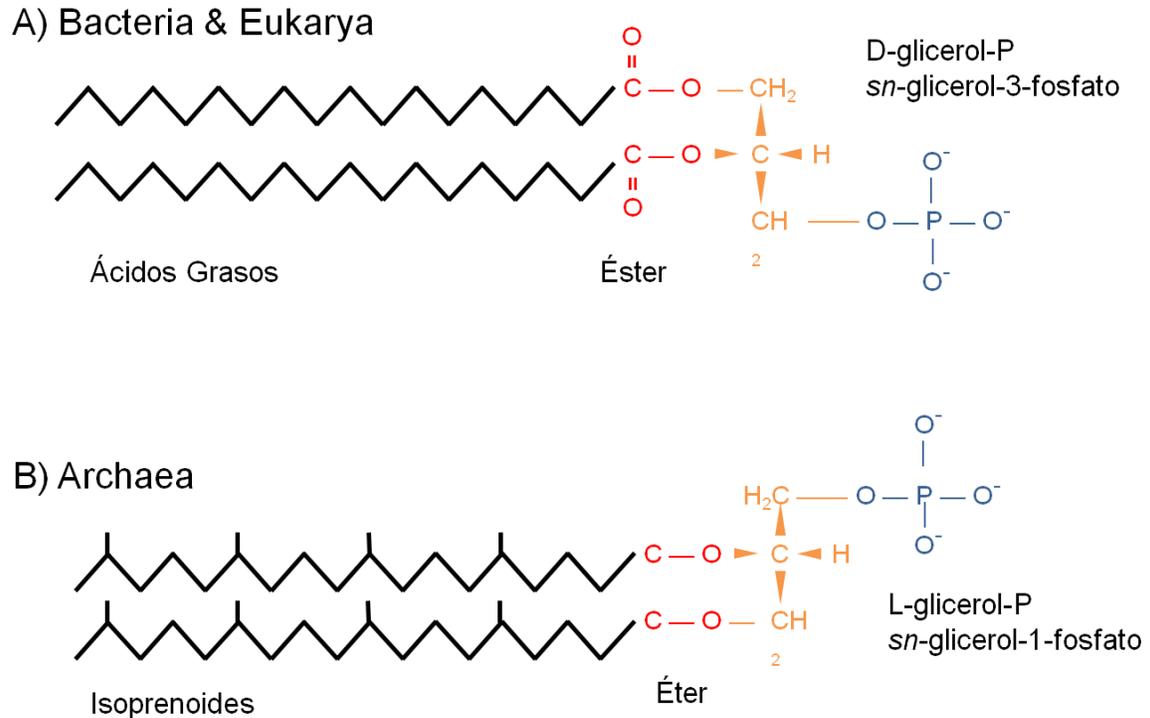


Figura 1. Diferencias bioquímicas entre los lípidos de la membrana de arqueas, bacterias y eucariontes.

1.2.3 Biosíntesis de Isoprenoides

El isopentenil difosfato es el precursor universal de los isoprenoides. En la mayoría de los eucariontes la síntesis de este compuesto se lleva a cabo por la vía del mevalonato y en las arqueas a través de una versión modificada de la misma ruta (Smit y Mushegian 2000; Kuzuyama 2002). Una ruta biosintética no homóloga de este precursor, la ruta del metileritritol fosfato, prevalece en las bacterias y los eucariontes fotosintéticos (Kuzuyama 2002).

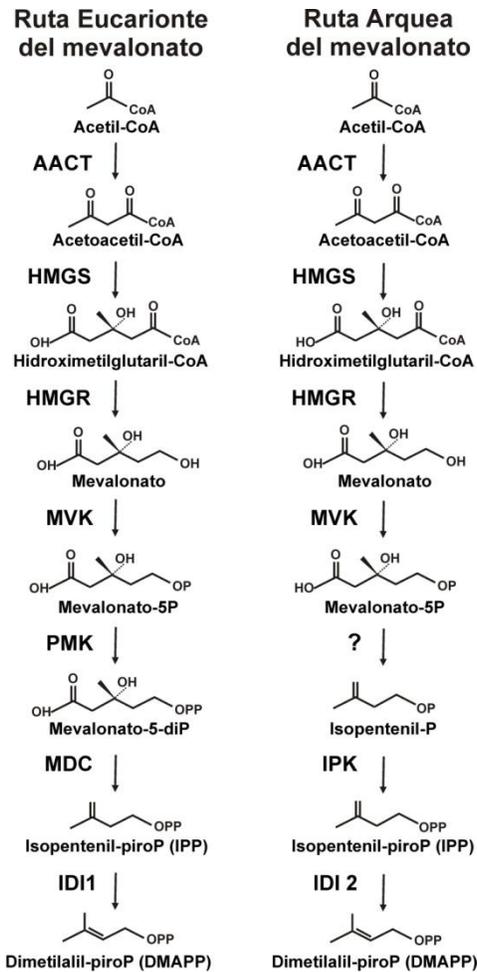


Figura 2. Ruta del mevalonato de arqueas y eucariontes. AACT, acetoacetyl-CoA tiolasa; HMGS, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa; HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; MVK, mevalonato cinasa; PMK, fosfomevalonato cinasa; MDC, difosfomevalonato descarboxilasa; IDI, isopentenil difosfato isomerasa.

El origen de la ruta del mevalonato no es claro. Boucher y Doolittle (2000) y Boucher, Kamekura y Doolittle (2004) propusieron que la ruta del mevalonato no estuvo presente en el último ancestro común y que su ocurrencia en bacterias se debe a eventos de transferencia horizontal de genes posteriores al surgimiento de la ruta del metileritritol fosfato en estos organismos. Por otro lado, Lombard y Moreira (2011a) propusieron que una ruta semejante a la ruta del mevalonato de los eucariontes estuvo presente en el último ancestro común; dicha ruta fue heredada verticalmente por arqueas, bacterias y eucariontes y, posteriormente, fue sustituida por la ruta del metileritritol fosfato en bacterias. Smit y Mushegian (2000) propusieron que el remplazo no-homólogo causó las diferencias entre la ruta del mevalonato de las arqueas y los eucariontes. Su hipótesis fue confirmada parcialmente por el descubrimiento de la isopentenil difosfato isomerasa 2 (Kaneda *et al.* 2001) y de la isopentenil fosfato cinasa (Grochowski, Xu y

White 2006), enzimas de origen polifilético que catalizan dos de las últimas tres reacciones de la síntesis enzimática del isopentenil difosfato en arqueas.

1.2.4 Biosíntesis de Ácidos Grasos

Existen dos variantes moleculares de la biosíntesis de ácidos grasos: FAS I y FAS II. En la variante FAS I un péptido multienzimático cataliza todas las reacciones del ciclo. La variante FAS I es común en mamíferos, hongos y organismos bacterianos pertenecientes al grupo *Corynebacterium*-*Mycobacterium*-*Nocardia* (Schweizer y Hofmann 2004; Smith y Tsai 2007). Por otro lado, cada reacción de la ruta FAS II es catalizada por una enzima discreta. La variante FAS II predomina en bacterias y plantas (Campbell y Cronan 2001). Homólogos de los genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos han sido detectados en arqueas, lo cual sugiere que esta ruta pudo haber estado presente en el último ancestro común (Peretó, López-García y Moreira 2004). Se ha propuesto que los péptidos multifuncionales que sintetizan los ácidos grasos en animales, hongos y algunas bacterias son producto de la fusión de genes de la FAS II (McCarthy y Hardie 1984).

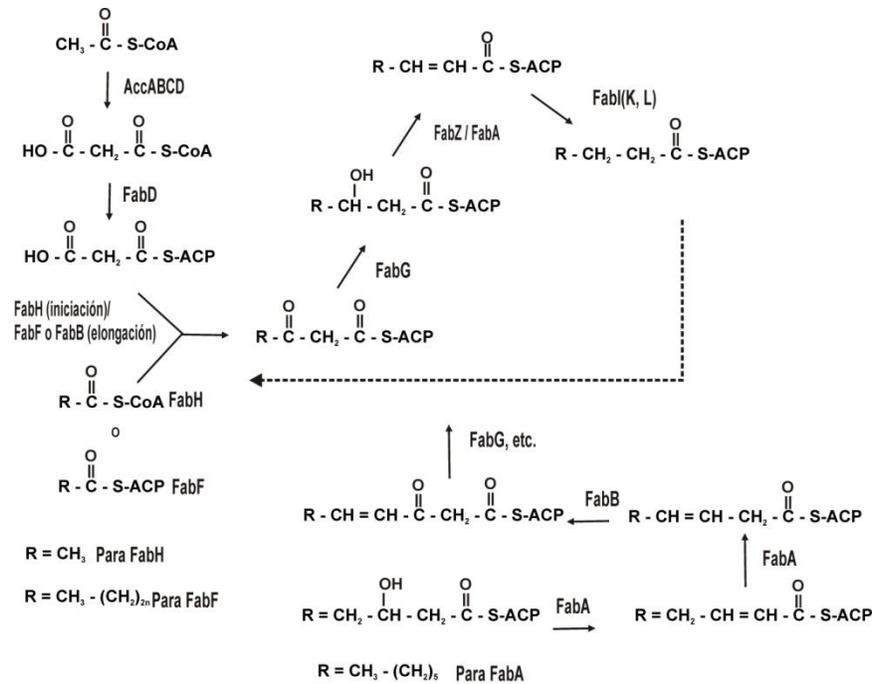


Figura 3. Biosíntesis de ácidos grasos II. AccC, biotina carboxilasa; AccB, proteína acarreadora de biotina carboxilada; AccA, carboxiltransferasa subunidad α ; AccD, carboxiltransferasa subunidad β ; ACP, proteína acarreadora de acilos; FabD, malonil-CoA:ACP transacilasa; FabH, β -cetoacil-ACP sintasa III; FabB, β -cetoacil-ACP sintasa I; FabF, β -cetoacil-ACP sintasa II; FabG, β -cetoacil-ACP reductasa; FabZ, β -hidroxiacil-ACP deshidratasa; FabA, β -hidroxiacil-ACP deshidratasa; FabI, enoil-ACP reductasa I; FabK, enoil-ACP reductasa II; FabL, enoil-ACP reductasa III.

1.2.5 Biosíntesis de Triacilgliceroles

Los triacilglicerolos son compuestos lipídicos capaces de almacenar energía y contener compuestos tóxicos. Los eucariontes pueden sintetizarlos de dos maneras: (a) la síntesis *de novo* a partir de G3P y (b) la síntesis a partir de monoacilglicerol (Shi y Cheng 2009). La síntesis de triglicéridos ocurre por una vía alterna no-homóloga en algunos procariontes, particularmente en el grupo de las actinobacterias (Alvarez y Steinbüchel 2002).

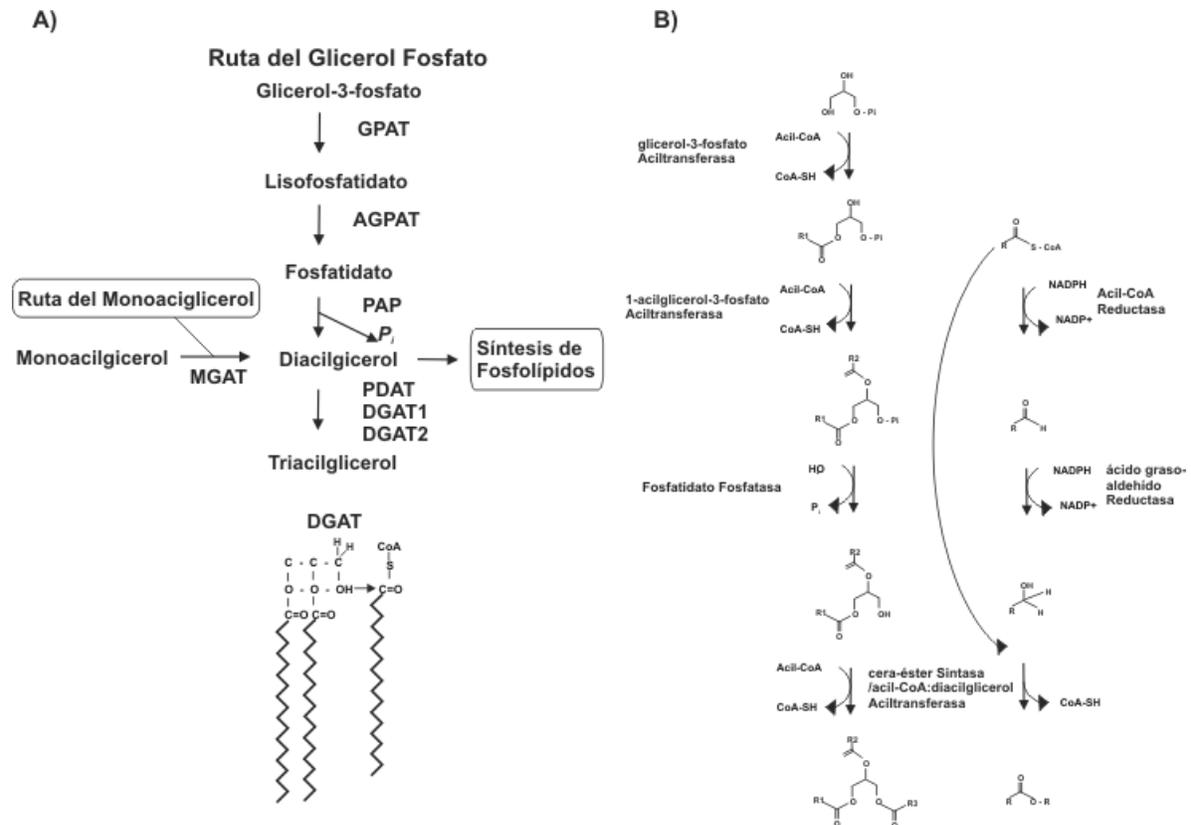


Figura 4. Biosíntesis de Triacilglicerolos. A) Ruta eucarionte. GPAT, glicerol-fosfato aciltransferasa; AGPAT, acil-glicerol-fosfato aciltransferasa; PAP, ácido fosfatídico fosfohidrolasa; MGAT, acil-CoA:monoacilglicerol aciltransferasa; DGAT, acil-CoA:diacilglicerol acil-transferasa; PDAT, fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa. B) Ruta bacteriana.

En la mayoría de los eucariontes la reacción que permite la formación de triésteres de glicerol puede ser catalizada por tres enzimas distintas y de origen polifilético: la acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 1 (Cases *et al.* 1998), la acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 2 (Cases *et al.* 2001) y la fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa (Dahlqvist *et al.* 2000). La cera sintasa/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa (WS/DGAT) es una enzima bifuncional que cataliza la síntesis de ésteres lineares (ceras) y triacilglicerolos en bacterias (Wältermann, Stöveken y Steinbüchel 2007). La WS/DGAT bacteriana no comparte un origen común con ninguna de las enzimas que catalizan la síntesis de triglicéridos en eucariontes ni con la cera sintasa que cataliza la síntesis de ceras en

Simmondsia chinensis (Lardizabal *et al.* 2000; Wältermann, Stöveken y Steinbüchel 2007). Sin embargo, se ha identificado en *Petunia hybrida* una WS/DGAT con estructura primaria similar a la WS/DGAT de *Acinetobacter calcoaceticus* (King *et al.* 2007). Turkish y Sturley (2009) propusieron que la biosíntesis de estos compuestos surgió primero en bacterias, dónde fueron útiles para contener compuestos tóxicos.

1.2.6 Segundos Mensajeros Lipídicos

Los segundos mensajeros son moléculas liberadas en el interior de las células que transducen señales extracelulares al interior de la célula. Desde su descubrimiento, se ha descrito una gran variedad de moléculas lipídicas que funcionan como segundos mensajeros (Liscovitch y Cantley 1994; Spiegel, Foster y Kolesnick 1996; Prokazova *et al.* 2007).

1.2.6.1 Biosíntesis de Fosfoinosítidos

Un fosfoinosítido es un fosfolípido que contiene uno o más inositoles modificados por la adición de uno o más grupos fosfato. Los derivados del inositol son comunes en todos los eucariontes y están ampliamente distribuidos en las arqueas, aunque no se han detectado en halófilas extremas. La presencia de estos compuestos sólo se ha reportado en actinobacterias y bacterias hipertermófilas (Michell 2007, 2008, 2011). Las arqueas usan el inositol para sintetizar fosfolípidos de la membrana y solutos compatibles (Rodrigues *et al.* 2009). Por otro lado, los eucariontes utilizan los derivados del inositol para regular numerosos procesos celulares (Rhee y Bae 1997). La biosíntesis de inositol y sus derivados inicia con la producción de *D-mio*-inositol-3-fosfato a partir de la ciclación de *D*-glucosa-6-fosfato. Todas las *mio*-inositol-3-fosfato sintasas que utilizan los seres vivos para generar *D-mio*-inositol-3-fosfato tienen un origen común (Michell 2007). El análisis filogenético sugiere que las bacterias adquirieron esta enzima por transferencia horizontal de genes (Nesbø *et al.* 2001). Michell (2007, 2008, 2011) ha sugerido que el inositol fue sintetizado por primera vez en arqueas y que la diversificación de las funciones del inositol ocurrió en eucariontes, luego de la separación de los linajes que dieron origen a los amebazoos y metazoos.

1.2.6.2 Biosíntesis de Esteroles

Los esteroides son una clase de esteroides que se caracterizan por tener un núcleo de cuatro anillos compuesto de tres anillos de seis carbonos y un anillo de cinco carbonos. La mayoría de los esteroides contiene una cadena lateral de 8 a 10 carbonos en la posición 17. Los esteroides son un rasgo distintivo de los eucariontes. En estos organismos, los esteroides brindan estabilidad a la membrana celular y son la base de algunas hormonas que participan en la regulación celular. La presencia de esteroides sólo ha sido reportada en

pocas especies de bacterias como: *Methylococcus capsulatus* (Bird *et al.* 1971; Bouvier *et al.* 1976), *Gemmata obsucuriglobus* (Pearson, Budin y Brocks 2003) y algunas especies de Myxobacteria (Bode *et al.* 2003). Los esteroides controlan la fluidez y la permeabilidad de la membrana de estos organismos. No se han reportado arqueas capaces de sintetizar esteroides (Desmond y Gribaldo 2009).

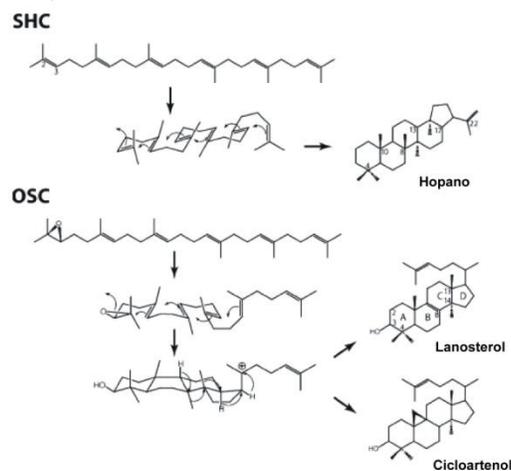


Figura 5. Biosíntesis de terpenoides policíclicos. SHC, escualeno-hopano ciclasa; OSC óxido-escualeno ciclasa.

Dado que la biosíntesis de esteroides es un proceso estrictamente aerobio, se ha asumido que la síntesis de este tipo de esteroides sólo pudo ocurrir hasta que hubo suficiente O^2 en la atmósfera (Galea y Brown 2009). Se ha propuesto que la síntesis anaerobia de hopanoides en bacterias antecedió la síntesis aerobia de esteroides en eucariontes y que la síntesis de esteroides en bacterias es resultado de la transferencia horizontal de genes. Estudios basados en modelos de evolución mínima han rechazado la idea de que la acumulación de O^2 en la atmósfera haya sido un factor clave para el origen de la biosíntesis de esteroides y han objetado la propuesta de la síntesis de hopanoides como predecesora de la síntesis de esteroides. En estos estudios se propone que la síntesis de hopanoides y la síntesis de esteroides comparten un origen común y su orden de aparición es incierta, y se sugiere que el factor que determinó la aparición de estos compuestos fue la preferencia por el plegamiento adoptado por el sustrato que utiliza la oxidoescualeno ciclasa (OSC) para producir estos hidrocarburos tetracíclicos (Fischer y Pearson 2007).

1.2.6.3 Biosíntesis de Esfingolípidos

Los esfingolípidos son una clase de lípidos que se distingue por contener una base esfingioide a la cual se unen un ácido graso y un grupo polar (Futerman y Riezman 2005). Su distribución en eucariontes es ubicua, pero en bacterias su ocurrencia es escasa y

restringida casi siempre a organismos anaerobios (Olsen y Jantzen 2001). No existen en la literatura reportes de estos compuestos en arqueas. En eucariontes, los esfingolípidos están involucrados en la regulación de muchos procesos celulares y son componentes esenciales de las balsas lipídicas que forman parte de la membrana celular (Prieschl y Baumruker 2000; Hannun y Obeid 2008). En bacterias, la función biológica de los esfingolípidos no es clara, aunque recientemente se ha reportado que *Sphingomonas capsulata* los utiliza para remplazar funcionalmente los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana exterior (Olsen y Jantzen 2001; Geiger *et al.* 2010). En algunas especies de bacterias se han aislado las enzimas serina palmitoil transferasa y esfingosina 1-fosfato liasa (Yard *et al.* 2007 y Bourquin *et al.* 2010). En eucariontes, la serina palmitoil transferasa cataliza la primera reacción de la biosíntesis de esfingolípidos y la esfingosina 1-fosfato liasa cataliza la reacción que produce la mayor cantidad de metabolitos generados en esta ruta biosintética (Futerman y Riezman 2005). La serina palmitoil transferasa pertenece a una familia de α -oxoamina sintasas dependientes de piridoxal 5'-fosfato (Futerman y Riezman 2005). Por lo que se ha sugerido que la síntesis de esfingolípidos tuvo su origen en bacterias a partir de otros miembros de la familia de α -oxoamina sintasas (Hannich, Umebayashi y Riezman 2011).

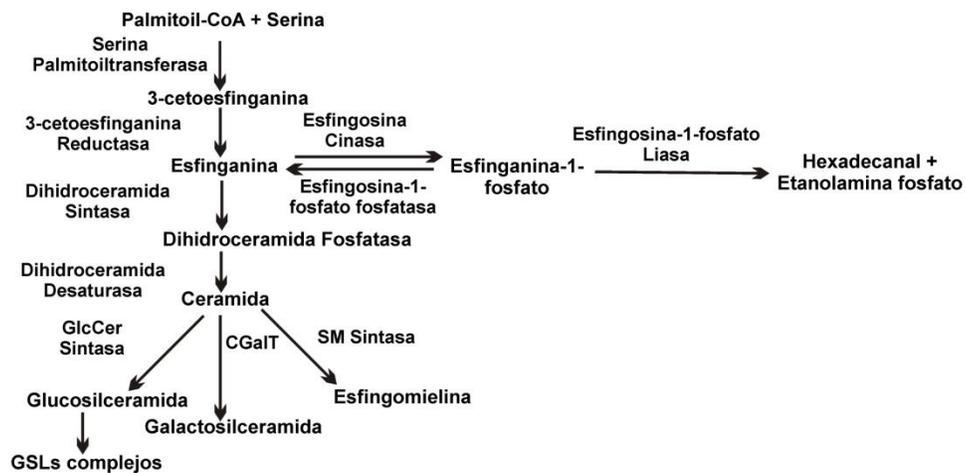


Figura 6. Biosíntesis de esfingolípidos.

II. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es proporcionar una perspectiva general del metabolismo de lípidos de las arqueas. Los objetivos particulares son: 1) identificar las enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos en arqueas y 2) proponer un escenario evolutivo para dicho metabolismo.

III. Metodología

Las secuencias de aminoácidos de todas las enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos y/o el metabolismo de terpenoides y policétidos fueron descargadas de la base de datos KEGG (Aoki-Kinoshita y Kanehisa 2007). Todos los proteomas de las arqueas, bacterias y eucariontes utilizados en este estudio también fueron descargados de la misma base de datos.

Cada enzima almacenada en la base de datos KEGG posee una clave única conocida como número *K*. A todos los genes homólogos de una enzima previamente caracterizada se les asigna la misma etiqueta de manera automática. Con el fin de evitar sesgos en la búsqueda de genes homólogos, se identificaron los grupos de ortólogos comprendidos por el mismo número *K*. Todas las secuencias asignadas al mismo número *K* fueron comparadas con ellas mismas empleando BLAST (Altschul *et al.* 1990). Sólo se seleccionaron los hits con un *e*-value $\Rightarrow 1 \times 10^{-10}$ y si fueron producto de una comparación de secuencias que compartieron $\Rightarrow 75\%$ de la longitud total. Todas las secuencias que compartieron los mismos resultados fueron catalogadas dentro del mismo grupo ortólogo. Una secuencia de cada grupo ortólogo fue seleccionada y sus homólogos fueron buscados con BLAST (*e*-value $\Rightarrow 1 \times 10^{-10}$) en los proteomas de arqueas.

Las enzimas que requieren O^2 para llevar a cabo su función fueron identificadas utilizando la base de datos KEGG Compunds. Las coenzimas asociadas a las enzimas involucradas en las rutas FAS II, MVA y MEP fueron identificadas con la base de datos BRENDA (Scheer *et al.* 2011). Los dominios proteínicos de las enzimas detectadas fueron detectados con la base de datos Pfam (Finn *et al.* 2010).

Las secuencias fueron alineadas con MUSCLE (Edgar 2004) y las filogenias estimadas con el método de Neighbor-Joining y su soporte estadístico fue calculado con una prueba de bootstrap (100 réplicas) en el programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011). La filogenia utilizada para la reconstrucción de caracteres ancestrales fue estimada con RaxML (Stamatakis 2006) utilizando el modelo GTRGAMMAI y un número *p* igual a 1000. La reconstrucción de caracteres ancestrales se llevó a cabo con el programa Mesquite v2.75 (Maddison y Maddison 2011) utilizando un modelo de máxima verosimilitud.

IV. Resultados

4.1 Biosíntesis de Ácidos Grasos y Fosfolípidos

El glicerol-3-fosfato puede ser sintetizado de dos maneras: reduciendo dihidroxiacetona fosfato o fosforilando glicerol. La primera reacción es catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (*gpsA*) y la segunda es catalizada por la glicerol cinasa (*glpK*). *GpsA* sólo fue detectada en 6 euriarqueas, mientras que *glpK* fue detectada en 45 miembros de los phyla Euryarchaeota, Crenarchaeota y Korarchaeota (cuadro 1).

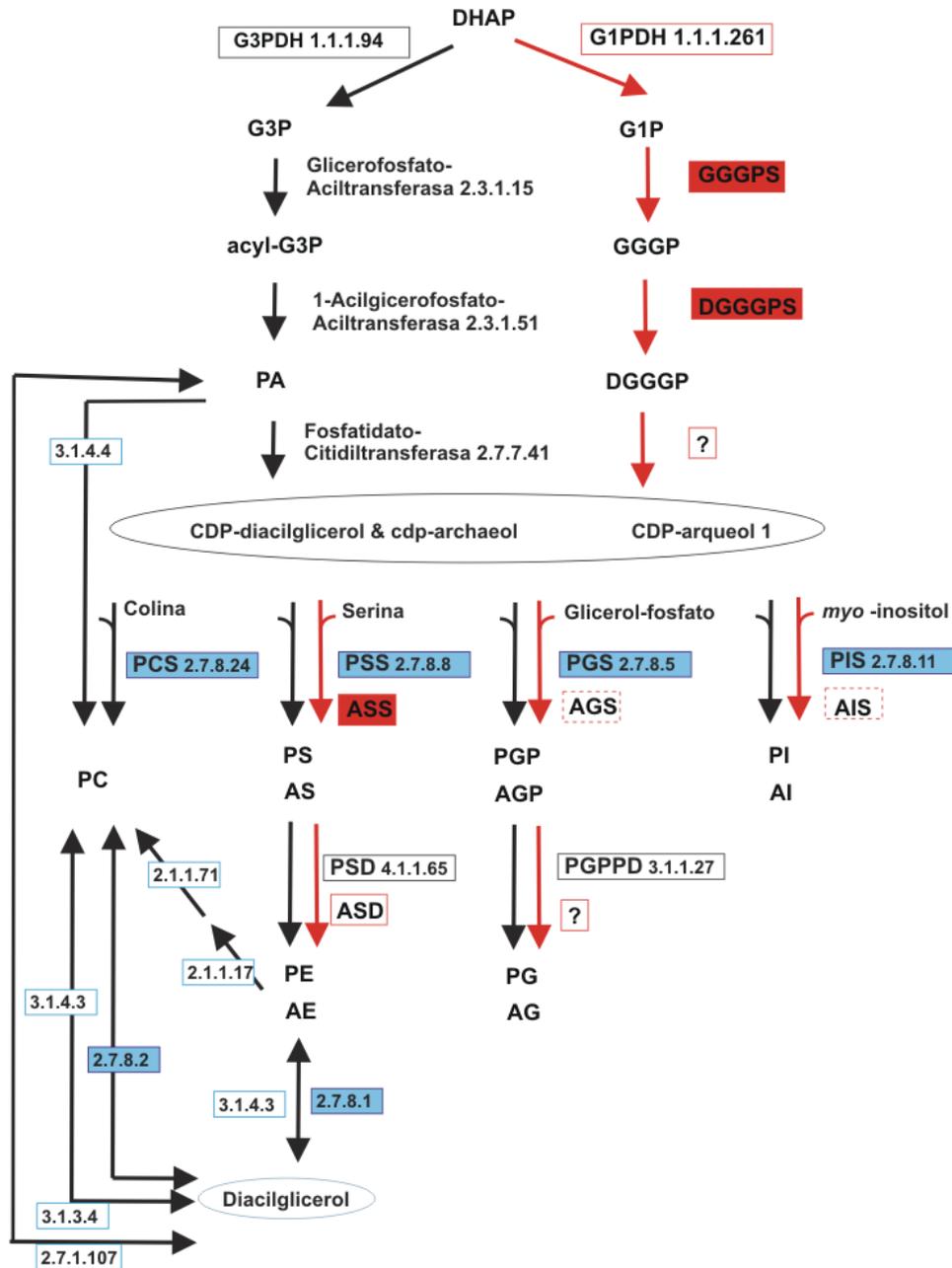


Figura 7. Biosíntesis de lípidos polares. G3PDH, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; G1PDH, glicerol-1-fosfato deshidrogenasa; G3P, glicerol-3-fosfato; G1P, glicerol-1-fosfato; GGGP, 3-*O*-geranilgeranil-*sn*-glicerol fosfato; GGGPS, GGGP sintasa; PA, ácido fosfatídico; DGGGP, 2,3-di-*O*-geranilgeranil-*sn*-glicerol-fosfato; DGGGPS, DGGGP sintasa; CDP citidín difosfato; PCS, fosfatidilcolina sintasa; PSS, fosfatidilserina sintasa; PGS, fosfatidilglicerol sintasa; PIS; fosfatidilinositol sintasa; ASS, arquetidilserina sintasa; AGS, arquetidilglicerol sintasa; AIS, arquetidilinositol sintasa; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; AS, arquetidilserina; PGP, fosfatidilglicerolfosfato; AGP, arquetidilglicerolfosfato; PI fosfatidilinositol; AS, arquetidilinositol; PSD fosfatidilserina descarboxilasa; PGPP, fosfatidilglicerolfosfato fosfatasa; ASD, arquetidilserina descarboxilasa; PE, fosfatidiletanolamina; AE, arquetidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; AG, arquetidilglicerol.

La frecuencia de ocurrencia de la glicerol cinasa en arqueas y su amplia distribución sugieren que pudo haber estado presente en el último ancestro común de estos organismos (cuadro 1). Sin embargo, la distribución irregular de esta proteína sugiere lo contrario, y que su ocurrencia se debe a múltiples eventos de transferencia horizontal de genes. La reconstrucción ancestral de caracteres apoya la primera hipótesis. Pero, debido a que las relaciones internas de este grupo no pudieron resolverse los resultados de este análisis podrían ser producto de un artefacto.

5.1.2 Biosíntesis de Ácidos Grasos

La acetil-CoA carboxilasa cataliza la síntesis del sustrato necesario para iniciar la FAS II en bacterias. Esta proteína pertenece a una gran familia de enzimas dependientes de biotina involucradas en una amplia variedad de procesos metabólicos. Todos los miembros de esta familia contienen el dominio BCCP, mientras que el dominio BC sólo está presente en las biotinas carboxilasas. Los dominios CT son de origen polifilético y confieren a las distintas carboxilasas su especificidad (Jitrapakdee y Wallace, 2003).

Dos carboxilasas dependientes de biotina (BDC) han sido identificadas en arqueas: una acetil/propionil-CoA carboxilasa involucrada en la fijación de CO₂ por la vía del 3-hidroxi-*propionato*/4-hidroxi-*butirato* (Menendez *et al.* 1999; Chuakrut *et al.* 2003; Hügler *et al.* 2003) y una piruvato carboxilasa involucrada en el ciclo del citrato y la glucogenogénesis (Mukhopadhyay, Stoddard y Wolfe 1998; Mukhopadhyay, Patel, Wolfe 2000). Líneas experimentales independientes han rechazado la participación de la acetil/propionil-CoA carboxilasa arqueal en la biosíntesis de ácidos grasos (Cronan 2001; Hügler *et al.* 2003).

La capacidad de fijar CO₂ por la vía del 3-hidroxi-*propionato*/4-hidroxi-*butirato* sólo ha sido descrito en organismos sulfobacterales y metalosphaerales (Berg *et al.* 2010), pero la distribución del dominio CT sugiere que esta habilidad no se restringe a este orden (cuadro 1). Sin embargo, la subunidad BCCP no fue detectada en estas especies (cuadro 1). El tamaño de este péptido es de ~90 residuos y su estructura primaria está poco conservada (Lombard y Moreira 2011b), factores pudieron haber afectado la búsqueda de esta subunidad en los genomas de arqueas. El dominio BC está presente en la mayoría de estos organismos y ocasionalmente se detectaron copias adicionales del gen que codifica esta subunidad. En la filogenia estimada con todas estas secuencias se distinguen dos grandes clados: en uno se agrupan genes involucrados en la biosíntesis de pirimidina y arginina (Holden, Thoden y Raushel 1999) y el otro incluye los genes que codifican la subunidad BC de la ACC (datos no mostrados). La búsqueda de dominios proteínicos indica que las secuencias anidadas en el segundo grupo conservan un arreglo similar constituido por los dominios CPSase_L_chain, CPSase_L_D2 y Biotin_carb_C (cuadro 7).

Cuadro 7. Dominios proteínicos que integran la subunidad BC de las enzimas acetil-CoA carboxilasa, piruvato carboxilasa y propionil carboxilasa.

| Enzima | KO | Dominio Celular | Dominios Proteínicos | | | |
|--|--------|-----------------|----------------------|----------|---------------|----------------|
| Acetil-CoA carboxilasa | K01961 | Bacteria | CPSase_L_chain | CPS_L_D2 | Biotin_carb_C | |
| | | Archaea | CPSase_L_chain | CPS_L_D2 | Biotin_carb_C | |
| Piruvato carboxilasa | K01951 | Bacteria | CPSase_L_chain | CPS_L_D2 | Biotin_carb_C | |
| | | Archaea | CPSase_L_chain | CPS_L_D2 | Biotin_carb_C | *BPL_LpIA_LipB |
| Propionil-CoA carboxilasa | K01965 | Bacteria | CPSase_L_chain | CPS_L_D2 | Biotin_carb_C | Biotin_lipoyl |
| Acetil-/propionil-CoA Carboxilasa | K01964 | Archaea | CPSase_L_chain | CPS_L_D2 | Biotin_carb_C | |
| Acetil-/propionil-CoA Carboxilasa | K11263 | Archaea | CPSase_L_chain | CPS_L_D2 | Biotin_carb_C | Biotin_lipoyl |

El análisis filogenético revela que estas secuencias se agrupan en tres clados. En el primero podemos observar genes que pertenecen exclusivamente a organismos de los órdenes Sulfolobus y Metallosphaera. Estos genes codifican la subunidad BC de la acetil/propionil-CoA carboxilasa involucrada en la fijación de CO₂. A pesar de que se detectaron otras secuencias identificadas con el mismo número K éstas no se agruparon en el mismo clado. De hecho, algunos de estos genes codifican la subunidad A de la piruvato carboxilasa, proteína que también pertenece a la gran familia de enzimas dependientes de biotina (Mukhopadhyay, Patel, Wolfe 2000). *Cenarchaeum symbiosum* emplea una versión modificada del ciclo del 3-hidroxipropionato/4-hidroxi-butirato (Berg *et al.* 2010). Esto podría explicar por qué se agrupa en el mismo clado, pero no junto a las otras secuencias. En el segundo clado se agruparon genes que sólo pertenecen a organismos halófilos. Estos genes también están clasificados como una acetil/propionil-CoA carboxilasa, pero el número K que se les ha asignado es distinto. La capacidad de fijar CO₂ en estos organismos no ha sido reportada y tampoco existen reportes sobre la función de estos genes. En el mismo clado se agrupa la secuencia que codifica la carbamoil-fosfato sintasa de *Natrialba magdii*. Sin embargo, es necesario el análisis experimental de estas proteínas para determinar su verdadera función. Aunque en el tercer clado se agrupan todas las secuencias que codifican la subunidad A de la piruvato carboxilasa de estos organismos, la subunidad A de la piruvato carboxilasa de *Pseudomonas aeruginosa* no se anida en este grupo, posiblemente porque estas secuencias han divergido mucho a través del tiempo.

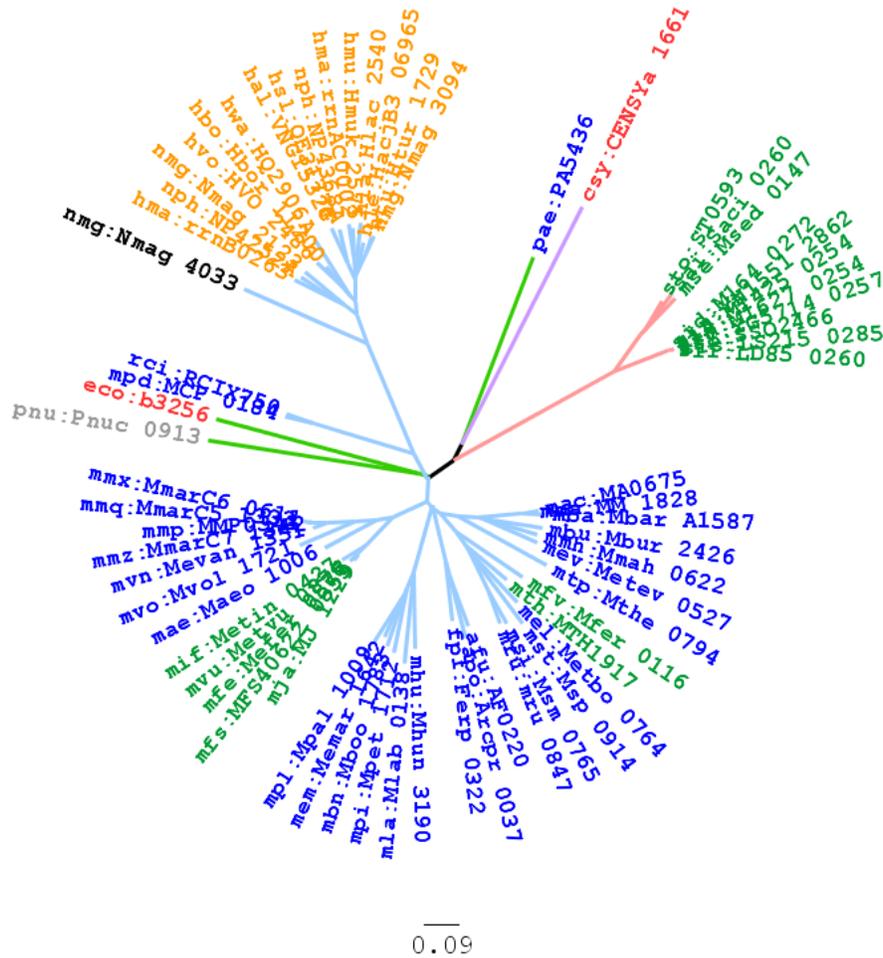


Figura 8. Análisis filogenético de la subunidad BC. En anaranjado la subunidad BC de la acetil-/propionil-CoA carboxilasa (K11263); en verde la subunidad BC de la acetil-CoA/propionil-CoA carboxilasa (K01964); en azul la subunidad BC de la piruvato carboxilasa (K01959); en rojo la subunidad BC de la acetil-CoA carboxilasa (K01961); en gris la subunidad BC de la propionil-CoA carboxilasa (K01965); y en negro la subunidad BC de la carbamoil-fosfato sintasa (K01955). El color de las ramas indica la procedencia de las secuencias: verde para bacterias, azul para euriarqueotas, rosa para crenarqueotas y morado para thumarqueotas.

La proteína acarreadora de acilos (ACP) transporta los productos intermedios de la síntesis de ácidos grasos e interacciona con todas las enzimas involucradas en este proceso excepto la acetil-CoA carboxilasa. La ACP sintasa activa la ACP transfiriéndole el grupo prostético al cual la malonil-CoA:ACP transacilasa habrá de transferir el malonato producido por la acetil-CoA carboxilasa. Ninguna de estas enzimas ha sido detectada en estudios anteriores (Peretó, López-García y Moreira 2004; Lombard, López-García y Moreira 2012b) y tampoco fueron detectadas en este trabajo. Peretó, López-García y Moreira (2004) en un principio propusieron que enzimas análogas aún no descritas llevaban a cabo estas reacciones, pero recientemente Lombard, López-García y Moreira (2012b) propusieron que las arqueas pueden sintetizar ácidos grasos en ausencia de estas

proteínas. En el mismo trabajo los autores sostienen que estas moléculas pudieron prevalecer en la membrana de las bacterias gracias a este eficiente sistema de transporte y que las arqueas implementaron otros mecanismos para elaborar su membrana aunque conservaron elementos del sistema ancestral. Sin embargo, la biosíntesis de ácidos grasos es un proceso metabólico energéticamente costoso (Nelson y Cox 2005); una gran cantidad de arqueas ocupa hábitats donde el abasto energético es insuficiente para mantener la actividad celular (Valentine 2007). Por lo tanto, hubiera sido inconveniente para estos organismos invertir recursos valiosos en la producción de estos compuestos cuando los componentes de su membrana son los más adecuados para sobrevivir en ambientes extremos.

Todas las enzimas que catalizan las reacciones de elongación de la FAS II pertenecen a la superfamilia de las tiolasas y comparten un origen común. En la literatura no existe un consenso sobre la distribución de estas enzimas en el dominio Archaea y los resultados de este trabajo no concuerdan con ninguno de los reportes citados (cuadro 9). En este estudio sólo fue detectada la β -cetoacil-ACP sintasa III (FabH). FabH cataliza la primera reacción de condensación durante la fase de iniciación y las enzimas β -cetoacil-ACP sintasa I (fabB) y β -cetoacil-ACP sintasa II (fabF) lo hacen durante la fase de elongación. FabB y fabF además están involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, nuestros resultados indican que las arqueas son incapaces de sintetizar ácidos grasos saturados e insaturados. Sin embargo, la fabH de algunas bacterias puede producir cadenas alifáticas de 12 o más carbonos (Musayev *et al.* 2005). Este hecho abre la posibilidad a que las arqueas pudieran sintetizar ácidos grasos saturados de distinta longitud.

Cuadro 8. Distribución de las β -cetoacil-ACP sintasas en el dominio Archaea.

| Publicación | Iniciación | | Elongación | |
|---|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | B-cetoacil-ACP sintasa III | B-cetoacil-ACP sintasa I | B-cetoacil-ACP sintasa I | B-cetoacil-ACP sintasa II |
| Ortiz-Aldana (2013) | X | | | |
| Peretó, López-García y Moreira (2004) | X | | | X |
| Jiang, Kim y Suh (2008) | | X | | |
| Lombard, López-García y Moreira (2012b) | X | X | | X |

De las 81 secuencias reportadas en este estudio como β -cetoacil-ACP sintasa III, sólo 16 presentan los mismos dominios proteínicos que la β -cetoacil-ACP sintasa III de *E. coli* contiene (cuadro 9). Las demás presentan un arreglo distinto que no se asemeja al de ningún miembro de la superfamilia de las tiolasas. La comparación de dominios apoya la idea de que algunas arqueas sean capaces de sintetizar hidrocarburos alicíclicos.

Cuadro 9. Dominios proteínicos que integran las enzimas β -cetoacil-ACP sintasa I, II y III.

| Enzima | Dominios Proteínicos | |
|--|----------------------|-----------------|
| B-cetoacil-ACP sintasa I | Ketoacyl-synt | Ketoacyl-synt-C |
| B-cetoacil-ACP sintasa II | Ketoacyl-synt | Ketoacyl-synt-C |
| B-cetoacil-ACP sintasa III | ACP_syn_III | ACP_syn_III_C |
| 3-hidroxil-3-metilglutaril-CoA Sintasa | HMG_CoA_synt_N | HMG_CoA_synt_C |
| B-cetoacil-ACP sintasa III (a) | ACP_syn_III | ACP_syn_III_C |
| B-cetoacil-ACP sintasa III (b) | HMG_CoA_synt_N | ACP_syn_III_C |

El análisis filogenético robustece la posibilidad de que las secuencias que contienen los dominios ACP_syn_III y ACP_syn_III C pertenecen a enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos: la mayoría de las β -cetoacil-ACP sintasa III (a) se agrupa en el mismo clado donde se anida la β -cetoacil-ACP sintasa III de *E. coli*. Este análisis también sugiere que algunas de las secuencias que contienen los dominios HMG_CoA_synt_N y ACP_syn_III_C podrían llevar a cabo la misma función.

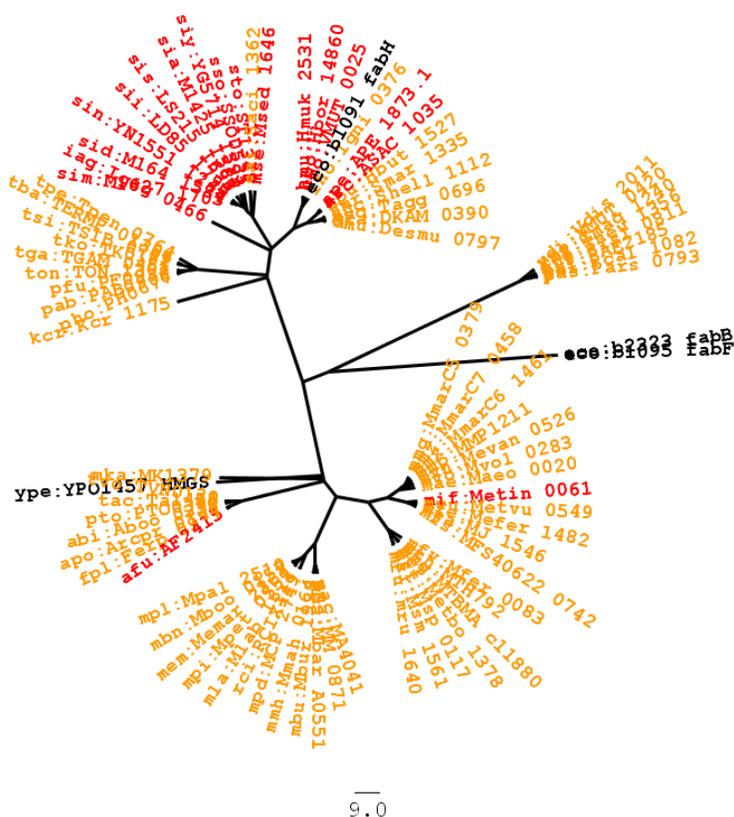


Figura 9. Análisis filogenético de la β -cetoacil-ACP sintasa III. En rojo las secuencias que contienen los dominios proteínicos ACP_syn_III y ACP_syn_III C y en naranja las secuencias las secuencias que contienen los dominios proteínicos HMG_CoA_synt_N y ACP_syn_III_C.

La β -cetoacil-ACP reductasa y las enoil-ACP reductasas I, II y III pertenecen a una nutrida familia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (Jörnvall *et al.* 1995; Oppermann *et al.* 2002). La mayoría de las secuencias detectadas presenta el dominio adh_short y sugiere que no se detectó ningún homólogo de fabK (material suplementario). Sin embargo el análisis composicional no es lo suficientemente sensible para distinguir una proteína de otra (cuadro 10). Y el soporte estadístico del análisis filogenético no es lo suficientemente robusto para permitirnos inferir cuáles enzimas encontramos (datos no mostrados).

Cuadro 10. Dominios proteínicos que integran las enzimas β -cetoacil-ACP reductasa y enoil-reductasas I, II y III.

| Enzima | Dominio Proteínico |
|---------------------------------|--------------------|
| β -cetoacil-ACP reductasa | adh_short |
| Enoil-ACP reductasa I | adh_short |
| Enoil-ACP reductasa II | NPD |
| Enoil-ACP reductasa III | adh_short |

Ninguna deshidratasa fue detectada en este trabajo. Sin embargo, en reportes anteriores se ha manifestado que los genomas de algunas arqueas contienen alguno de estos genes, aunque no se ha descrito su función (Peretó, López-García y Moreira 2004; Lombard y Moreira 2012). Es posible que el valor de corte y los estrictos métodos de selección hayan sesgado nuestra búsqueda.

5.1.3 Aciltransferasas

Las aciltransferasas son esenciales para la producción de glicerolípidos. Estas enzimas son las responsables de la formación del enlace éster entre el glicerol-3-fosfato y los ácidos grasos de bacterias y eucariontes. Nuestros resultados indican que las arqueas son incapaces de llevar a cabo esta unión. Lombard, López-García y Moreira (2012c) observaron la misma tendencia en el caso de la vía procarionte. Por lo tanto, nuestros resultados indican las arqueas son incapaces de usar fosfoglicerolípidos de naturaleza bacteriana/eucarionte para incorporarlos en su membrana citoplasmática o para almacenar energía.

5.2 Naturaleza de la Membrana del Último Ancestro Común

Las diferencias bioquímicas entre la membrana celular de arqueas, bacterias y eucariontes han impedido determinar la naturaleza del último ancestro común. En la actualidad el modelo propuesto por Peretó-López-García y Moreira (2004) y Lombard, López-García y Moreira (2012a) es el más aceptado. Según estos autores el cenancestro contaba con enzimas inespecíficas capaces de sintetizar G1P y G3P, a los cuáles se unían

isoprenoides y ácidos grasos, respectivamente. La distribución de las enzimas que participan en la síntesis de dichos compuestos apoya su esquema. Sin embargo, como se demuestra en este y otros trabajos (Lombard y Moreira 2012c), las aciltransferasas que unen las cadenas laterales a su estereoisómero correspondiente no son universales. Por lo tanto, es muy probable que estas enzimas hayan aparecido luego de que los dominios Bacteria y Archaea se separaron.

La acumulación de oxígeno en la atmósfera hace unos 2, 200 millones de años (ma) permitió el surgimiento de nuevas rutas metabólicas (Raymond y Blankenship 2004; Raymond y Segré 2006). Ninguna de las enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos e isoprenoides requiere O^2 para llevar a cabo su función. Por lo tanto, podemos deducir que ambas rutas aparecieron antes de que este compuesto se acumulara en la atmósfera.

Las coenzimas de origen biológico son moléculas accesorias que se unen de manera transitoria a las proteínas y son indispensables para que una enzima pueda llevar a cabo su función. El papel que desempeñan estas moléculas en el metabolismo moderno es fundamental y es bien aceptado que las coenzimas de origen ribonucleotídico y otros cofactores son los fósiles metabólicos más antiguos (Reyes-Prieto et al. 2012).

Cuadro 11. Coenzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos e isoprenoides.

| Coenzima | Ruta Metabólica | |
|---------------------------|-----------------|--------|
| | MVA | FAS II |
| 4'-fosfopantoteína | | X |
| ADP | X | |
| ATP | X | X |
| Biotina | | X |
| CoA | X | X |
| NAD | X | X |
| NADP | X | X |
| FMN | X | X |
| FAD | X | X |

Ambas rutas necesitan cofactores derivados de ribonucleótidos (cuadro 11). Sin embargo, esto no implica que sean antiguas. Por ejemplo, aunque la biosíntesis de colesterol es un proceso biológico reciente, también depende de cofactores derivados de ribonucleótidos (Hernández-Morales *et al.* en proceso). No obstante, la biosíntesis de ácidos grasos también precisa biotina y 4'-fosfopantoteína. Además de cofactores derivados de ribonucleótidos, la síntesis de biotina requiere coenzima A (Visser y Kellogg 1978). Considerando que la biosíntesis de coenzima A sólo depende de cofactores derivados de ribonucleótidos, la síntesis de biotina debió surgir después (Hernández-

Morales *et al.* en proceso). Por otro lado, La 4'-fosfopantoteína es un derivado del pantotenato. La biosíntesis de pantotenato requiere tetrahidrofolato, cuya biosíntesis sólo requiere cofactores derivados de ribonucleótidos. Por lo tanto, la biosíntesis de 4'-fosfopantoteína sólo pudo haber ocurrido una vez establecida la síntesis biológica de cofactores orgánicos derivados de ribonucleótidos (Hernández-Morales *et al.* en proceso). Antes de decidir cuál podría ser la ruta más antigua, debe ser analizado con detalle el contexto de las enzimas que requieren estos cofactores.

La 4'-fosfopantoteína es el vínculo entre la ACP y los productos intermedios de la biosíntesis de ácidos grasos. Como ha sido demostrado, la ACP no está presente en arqueas. El uso de este cofactor, por lo tanto, fortalece la idea de que existe un grupo primordial de enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos al que la ACP no pertenece porque fue una innovación implementada por las bacterias (Lombard y Moreira 2012b). Por otro lado, la biotina es el sitio de anclaje del grupo carboxilo que habrá de ser transferido al acetil-CoA para producir malonil-CoA, y así poder dar inicio a la biosíntesis de ácidos grasos. Entonces, aunque los pasos siguientes dependan de cofactores derivados de ribonucleótidos, este proceso sólo pudo haberse establecido una vez que la biotina pudo ser sintetizada biológicamente. De este modo, la biosíntesis de isoprenoides debió preceder a la biosíntesis de ácidos grasos. Sin embargo, la composición lipídica de la membrana del último ancestro común no puede ser determinada. Estas moléculas son producto de una etapa anterior a la aparición del LCA y seguramente estuvieron disponibles cuando esta entidad biológica habitó la tierra. Por lo tanto, el cenestruo pudo hacer uso de una amplia variedad de moléculas para darle soporte a esta estructura.

5.3 Almacenaje de Energía

La biosíntesis de triésteres de glicerol depende de las aciltransferasas involucradas en la síntesis de fosfoglicerolípidos y de aciltransferasas que catalizan la transferencia de una tercera cadena de ácidos grasos a la molécula de glicerol. Ninguna de estas enzimas fue detectada en este trabajo y la presencia de triglicéridos en estos organismos no ha sido demostrada (Wältermann y Steinbüchel 2006). Por lo tanto, podemos descartar que las arqueas sean capaces de utilizar estos compuestos para almacenar energía. Es posible que la biosíntesis de triésteres de glicerol haya surgido en bacterias como sugieren Turkish y Sturley (2009).

5.4 Segundos Mensajeros Lipídicos

Las hormonas esteroides pueden regular la expresión de los genes en organismos eucariontes. El colesterol es el precursor de estas hormonas y es un producto de la ciclación del triterpeno conocido como escualeno (Nelson y Cox 2005). Las óxido-

escualeno ciclasas que convierten el escualeno en un terpenoide policíclico no fueron detectadas. Además, nuestros datos indican que las enzimas que modifican el núcleo de cuatro anillos producido por las OSC tampoco son comunes en arqueas. Por lo tanto, nuestros resultados rechazan la posibilidad de que los terpenoides policíclicos regulen la expresión de los genes de estos organismos.

Según Hannich, Umehayashi y Riezmann (2011) biosíntesis de esfingolípidos surgió en bacterias. Su hipótesis se sustenta en la presencia de la serina palmitoil transferasa y la esfingosina 1-fosfato liasa en estos organismos. La distribución de ambas enzimas en el dominio Arquea es amplia. Sin embargo, la reconstrucción de caracteres ancestrales indica que es poco probable que estas enzimas hayan estado presentes en el cenancestro y que posiblemente fueron adquiridas en múltiples eventos de transporte horizontal de genes (Anexos).

VI. Conclusiones

Algunas especies del dominio Arquea tienen la posibilidad de sintetizar glicerol-3-fosfato y ácidos grasos. Pero son incapaces de producir fosfoglicerolípidos de naturaleza bacteriana/eucariote, porque las aciltransferasas que generan el enlace entre el G3P y los ácidos grasos están ausentes en estos organismos.

La biosíntesis de isoprenoides antecedió a la biosíntesis de ácidos grasos. Sin embargo, esto no implica que la membrana del cenancestro haya estado compuesta de isoprenoides, debido a que los productos de las rutas MVA y FAS II estuvieron disponibles cuando apareció el último ancestro común.

Las arqueas no pueden utilizar triésteres de glicerol como reservorios de energía o depósitos de sustancias tóxicas. Las enzimas que catalizan la transferencia de los ácidos grasos al glicerol-3-fosfato no están presentes en este grupo de procariontes.

Las arqueas no utilizan segundos mensajeros derivados de isoprenoides para regular la expresión de sus genes. La evidencia presentada en este trabajo es insuficiente para proponer que estos organismos son capaces de sintetizar esfingolípidos con la finalidad de regular algún proceso celular.

VII. Referencias

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Alvarez HM, Steinbüchel A. 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 367-376.

- Aoki-Kinoshita KF, Kanehisa M. 2007. Genome annotation and pathway mapping in KEGG. *Methods. Mol. Biol.* 396: 71-91.
- Barns SM, Fundyga RE, Jeffries MW, Pace NR. 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National hot spring environment. *Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 1609-1613.
- Berg IA, Kockelkorn D, Ramos-Vera WH, Say RF, Zarzycki J, Jügler M, Alber BE, Fuchs G. 2010. Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(6): 447-460.
- Bird CW, Lynch JM, Pirt FJ, Reid WW. 1971. Steroids and squalene in *Methylococcus capsulatus* growth on methane. *Nature.* 230: 473-474.
- Bode HB, Zeggel B, Silakowski B, Wenzel SC, Reichenbach H, Müller R. 2003. Steroid biosynthesis in prokaryotes: identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantica*. *Mol. Microbiol.* 47: 471-481.
- Boucher Y, Doolittle WF. 2000. The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol. Microbiol.* 37: 703-716.
- Boucher Y, Kamekura M, Doolittle WF. 2004. Origins and evolution of isoprenoid lipid biosynthesis in archaea. *Mol. Microbiol.* 52: 515-527.
- Bourquin F, Riezman H, Capitani G, Grütter MG. 2010. *Structure.* 18 : 1054-1065.
- Bouvier P, Rohmer M, Benveniste P, Ourisson G. 1976. $\Delta^8(14)$ -Steroids in the bacterium *Methylococcus capsulatus*. *Biochem. J.* 159: 267-271.
- Brochier-Armanet C, Gribaldo S, Forterre P. 2012. Spotlight on the Thaumarchaeota. *ISME J.* 6(2): 227-230.
- Brown JR, Doolittle WF. 1995. Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92: 2441-2445.
- Campbell JW, Cronan JE Jr. 2001. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 305-332.
- Cases S, Smith SJ, Zhen YW, *et al.* (13 coautores). 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13018:13023.

Cases S, Stone SJ, Zhouh P, Yen E, Two B, Lardizabal KD, Voelker T, Farese RV Jr. 2001. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J. Biol. Chem.* 276: 38870-38876.

Cavalier-Smith T. 2002. The neomoran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 7-76.

Cavicchioli R. 2006. Cold-adapted archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 331-343.

Chappe B, Albrecht P, Michaelis W. 1982. Polar lipids of archaeobacteria in sediments and petroleoums. *Science.* 17: 65-66.

Chuakrut S, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. 2003. Characterization of a bifunctional archaeal acyl coenzyme A carboxylase. *J. Bacteriol.* 185: 938-947.

Cronan JE Jr. 2001. The biotinyl domain of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. Evidence that the "thumb" structure is essential and that the domain functions as a dimer. *J. Biol. Chem.* 276: 37355-37364.

Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H, Stymne S. 2000. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 6487-6492.

DeLong EF. 2000. Extreme genomes. *Genome Biol.* 1: 1029.1-1029.3.

Desmond E, Gribaldo S. 2009. Phylogenomics of sterol synthesis: insights into the origin, evolution, and diversity of a key eukaryotic feature. *Genome Biol. Evol.* 10: 364-381.

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797.

Finn RD, Mistry J, Tate J, *et al.* (11 coautores). 2010. The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res.* 38: D211-D222.

Fischer WW, Pearson A. 2007. Hypotheses for the origin and early evolution of triterpenoid cyclases. *Geobiology.* 5: 19-34.

Futerman AH, Riezman H. 2005. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends. Cell. Biol.* 15: 312-318.

Fütterer O, Angelov A, Liesegang H, Gottschalk G, Schleper C, Schepers B, Dock C, Antranikian G, Liebel W. 2004. Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 9091-9096.

Galand PE, Fritze H, Conrad R, Yrjölä K. 2005. Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic archaea in three boreal peatland ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2195-2198.

Galea AM, Brown AJ. 2009. Special relationship between sterols and oxygen: were sterols and adaptation to aerobic life? *Free. Radic. Biol. Med.* 47: 880-889.

Geiger O, González-Silva N, López-Lara IM, Sohlenkamp C. 2010. Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Prog. Lipid. Res.* 49: 46-60.

Gogarten JP, Kibak H, Dittrich P, *et al.* 1989. Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86: 666-6665.

Graham DE, Overbeek R, Olsen GJ, Woese CR. 2000. An archaeal genomic signature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 3304-3308.

Gribaldo S, Cammarano P. 1998. The root of the universal tree of life inferred from anciently duplicated genes encoding components of the protein-targeting machinery. *J. Mol. Evol.* 47: 508-516.

Gribaldo S, Brochier-Armanet C. 2006. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Sci.* 361: 1007-1022.

Grochowski LL, Xu H, White RH. 2006. *Methanocaldococcus jannaschi* uses a modified mevalonate pathway for biosynthesis of isopentenyl diphosphate. *J. Bacteriol.* 188: 3192-3198.

Hannich JT, Umebayashi K, Riezman H. 2011. Distribution and functions of sterols and sphingolipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: a004762.

Hannun YA, Obeid LM. 2008. Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9: 139-150.

Hobel CF, Marteinson VT, Hreggvidsson GO, Kristjánsson JK. 2005. Investigation of the microbial ecology of intertidal hot springs by using diversity analysis of 16S rRNA and chitinase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2771-2776.

Holden HM, Thoden JB, Raushel FM. 1999. Carbamoyl phosphate synthetase: an amazing biochemical odyssey from substrate to product. *Cell Mol. Life Sci.* 58(5-6): 507-522.

Hügler M, Krieger RS, Jahn M, Fuchs G. 2003. Characterization of acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase in *Metallosphaera sedula*. Carboxylating enzyme in the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic carbon fixation. *Eur. J. Biochem.* 270: 736-744.

- Iwabe N, Kuma K, Hasegawa M, Osawa S, Miyata T. 1989. Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria and eukaaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86: 9355-9359.
- Jiang C, Kim SY, Suh DY. 2008. Divergent evolution of the thiolase superfamily and chalcone synthase family. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49: 691-701.
- Jitrapakdee S, Wallace JC. 2006. The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4(3): 217-229.
- Jørgensen BB, D'Hondt S. 2006. Ecology. A starving majority deep beneath the seafloor. *Science.* 314: 932-934.
- Jörnval H, Persson B, Krook M, Atrian S, González-Duarte R, Jeffery J, Gosh D. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry.* 34(18): 6003-6013.
- Kandler O, König H. 1998. Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 305-308.
- Kaneda K, Kuzuyama T, Takagi M, Hayakawa Y, Seto H. 2001. An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. Strain CL190. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 932-937.
- Kaneshiro SM, Clark DS. 1995. Pressure effects on the composition and thermal behavior of lipids from the deep-sea thermophile *Methanococcus jannaschii*.
- Keough BP, Schmidt TM, Hicks RE. 2003. Archaeal nucleic acids in picoplankton from great lakes on three continents. *Microbiol. Ecol.* 46: 238-48.
- Kim BS, Oh HM, Kang H, Chun J. 2005. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiols.* 43: 144-151.
- King A, Nam JW, Han J, Hilliard J, Jaworski JG. 2007. Cuticular wax biosynthesis in petunia petals: cloning and characterization of an alcohol-acyltransferase that synthesizes wax-esters. *Planta.* 226: 381-394.
- Knittel K, Lösekann T, Boetius A, Kort R, Amann R. 2005. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ. Microbiol.* 71: 467-479.
- Koga Y, Kyuragi T, Nishihara M, Sone N. 1998. Did archaeal and bacterial cells arise independently from noncellular precursors? A hypothesis stating that the advent of membrane phospholipid with enantiomeric glycerophosphate caused the separation of the two lines of descent. *J. Mol. Evol.* 46: 54-63.

Koga Y, Morii. 2007. Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 97-120.

Kuzuyama T. 2002. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1619-1627.

Lardizabal KD, Metz JG, Sakamoto T, Hutton WC, Pollard MR, Lassner MW. 2000. Purification of a jojoba embryo wax synthase, cloning of its cDNA, and production of high levels of wax in seeds of transgenic arabidopsis. *Plant. Physiol.* 122: 645-655.

Lawson FS, Charlebois RL, Dillon JA. 1996. Phylogenetic analysis of carbamoylphosphate synthetase genes: complex evolutionary history includes an internal duplication within a gene which can root the tree of life. *Mol. Biol. Evol.* 13: 970-977.

Liscovitch M, Cantley LC. 1994. Lipid second messengers. *Cell.* 77: 329-334.

Lombard J, Moreira D. 2011a. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol. Biol. Evol.* 28: 87-99.

Lombard J, Moreira D. 2011b. Early evolution of the biotin-dependent carboxylase family. *BMC Evol. Biol.* 9(11).

Lombard J, López-García P, Moreira D. 2012a. The early evolution of lipid membranes and the three domains of life. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(7): 507-515.

Lombard J, López-García P, Moreira D. 2012b. An ACP-independent fatty acid synthesis pathway in archaea: implications for the origin of phospholipids. *Mol. Biol. Evol.* 29(11): 3261-3265.

Lombard J, López-García P, Moreira D. 2012c. Phylogenomic investigation of phospholipid synthesis in archaea. *Archaea.* doi: 10.1155/2012/630910.

Maddison WP, Maddison DR. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. Available from: <http://mesquiteproject.org>.

McCarthy AD, Hardie DG. 1984. Fatty acid synthase – an example of protein evolution by gene fusion. *Trends. Biochem. Sci.* 9: 60-63.

Menendez C, Bauer Z, Huber H, Gad'on N, Stetter KO, Fuchs G. 1999. Presence of the acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase and propionyl-CoA carboxylase in autotrophic Crenarchaeota and indication for operation of a 3-hydroxypropionate cycle in autotrophic carbon fixation. *J. Bacteriol.* 181: 1088-1098.

- Michell RH. 2007. Evolution of the diverse biological roles of inositols. *Biochem. Soc. Symp.* 74: 223-246
- Michell RH. 2008. Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9: 151-161.
- Michell RH. 2011. Inositol and its derivatives: their evolution and functions. *Adv. Enzyme. Regul.* 51: 84-90.
- Mukhopadhyay B, Stoddard SF, Wolfe RS. 1998. Purification, regulation, and molecular and biochemical characterization of pyruvate carboxylase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain deltaH. *J. Biol. Chem.* 273(9): 5155-5166.
- Mukhopadhyay B, Patel VJ, Wolfe RS. 2000. A stable archaeal pyruvate carboxylase from the hyperthermophile *Methanococcus Jannaschii*. *Arch. Microbiol.* 174(6): 406-414.
- Murray AE, Preston CM, Massana R, Taylor LT, Blakis A, Wu K, DeLong EF. 1998. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2585-2595.
- Musayev F, Sachdeva S, Scarsdale JN, Reynolds KA, Wright HT. 2005. Crystal structure of a substrate complex of *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) with lauroyl-coenzyme A. *J. Mol. Biol.* 346(5): 13113-1321.
- Nelson D, Cox M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4a edición.
- Nesbø CL, L'Haridon S, Stetter KO, Doolittle WF. 2001. Phylogenetic analyses of two "archaeal" genes in *Thermotoga maritima* reveal multiple transfers between archaea and bacteria. *J. Mol. Biol.* 18: 362-375.
- Olsen I, Jantzen E. 2001. Sphingolipids in bacteria and fungi. *Anaerobe.* 7: 103-112.
- Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wu X, Lindh M, Shafqat J, Nordling E, Kallberg Y, Persson B, Jörnvall H. *Chem. Biol. Interact.* 143-144: 247-253.
- Oren A, Ginzburg M, Ginzburg BZ, Hochstein LI, Volcani BE. 1990. *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 209-210.
- Oren A, Gurevich P, Gemmell RT, Teske A. 1995. *Halobaculum gommorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 747-754.

Pearson A, Budin M, Brocks JJ. 2003. Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 15352-15357.

Peretó J, López-García P, Moreira D. 2004. Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution. *Trends. Biochem. Sci.* 29: 469-477.

Pester M, Schleper C, Wagner M. 2011. The Thaumarchaeota: an emerging view on their phylogeny and ecophysiology. *Curr. Opin. Microbiol.* 14(3): 300-306.

Prieschl EE, Baumruker T. 2000. Sphingolipids: second messengers, mediators and raft constituents in signaling. *Immunol. Today.* 21: 555-560.

Prokazova NV, Samoilova NN, Golovanova NK, Gracheva EV, Korotaeva AA, Andreeva ER. 2007. Lipid second messengers and cell signaling in vascular wall. *Biochemistry (Mosc).* 72: 797-808.

Raymond J, Blankenship RE. 2004. Biosynthetic pathways, gene replacement and the antiquity of life. *Geobiology.* 2: 199-203.

Raymond J, Segré D. 2006. The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science.* 311: 1764-1767.

Reyes-Prieto F, Hernández-Morales R, Jácome R, Becerra A, Lazcano A. 2012. Coenzymes, viruses and the RNA world. *Bochimie.* 94: 1467-1473.

Rhee SG, Bae YS. 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272: 15045-15048.

Rodrigues MV, Borges N, Almeida CP, Lamosa P, Santos H. 2009. A unique β -1,2-mannosyltransferase of *Thermotoga maritime* that uses di-myo-inositol phosphate as the mannosyl acceptor. *J. Bacteriol.* 19: 6105-6115.

Scheer M, Grote A, Chang A, Schomburg J, Munaretto C, Rother M, Schöngen C, Stelzer M, Thiele J, Schomburg D. 2011. BRENDA, the enzyme information system. 39: 670-676.

Schweizer E, Hofmann J. 2004. Microbial type I fatty acid synthase (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 501-517.

Shi Y, Cheng D. 2009. Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *Am. J. Endocrinol. Metab.* 297: 10-18.

Shimada H, Yamagishi A. 2011. Stability of heterochiral hybrid membrane made of bacterial sn-G3P lipids and archaeal sn-G1P lipids. *Biochemistry.* 50: 4114-4120.

- Skirnisdottir S, Hreggvidsson GO, Hjörleifsdottir S, Marteinson VT, Petursdottir SK, Holst O, Kristjansson JK. 2000. Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure on hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2835-2841.
- Smit A, Mushegian A. 2000. Biosynthesis of isoprenoides via mevalonato in Archaea: the lost pathway. *Genome. Res.* 10: 1468-1484.
- Smith S, Tsai SC. 2007. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat. Prod. Rep.* 24: 1041-1072.
- Spiegel S, Foster D, Kolesnik R. 1996. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 159-167.
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics.* 22: 2688-2690.
- Takai K, Horikoshi K. 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics.* 1285-1297.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Tronabene TG, Langworthy TA. 1979. Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaeobacteria. *Science.* 203: 51-53.
- Turskish AR, Sturley SL. 2009. The genetics of neutral lipid biosynthesis: an evolutionary perspective. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297: 19-27.
- Valentine DL. 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 316-323.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 112-124.
- Visser CM, Kellog RM. 1978. Biotin. Its place in evolution. *J. Mol. Evol.* 11(2): 171-187.
- Wächtershäuser G. 2003. From pre-cells to Eukarya – a tale of two lipids. *Mol. Microbiol.* 47: 13-22.
- Wälterman M, Steinbüchel A. 2006. Wax ester and triacylglycerol inclusions. *Microbiol. Monogr.* 1: 137-166.

Wältermann M, Stöveken T, Steinbüchel A. 2007. Key enzymes for biosynthesis of neutral lipid storage compounds in prokaryotes: properties, function and occurrence of wax ester synthases/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferases. *Biochimie*. 89: 230-242.

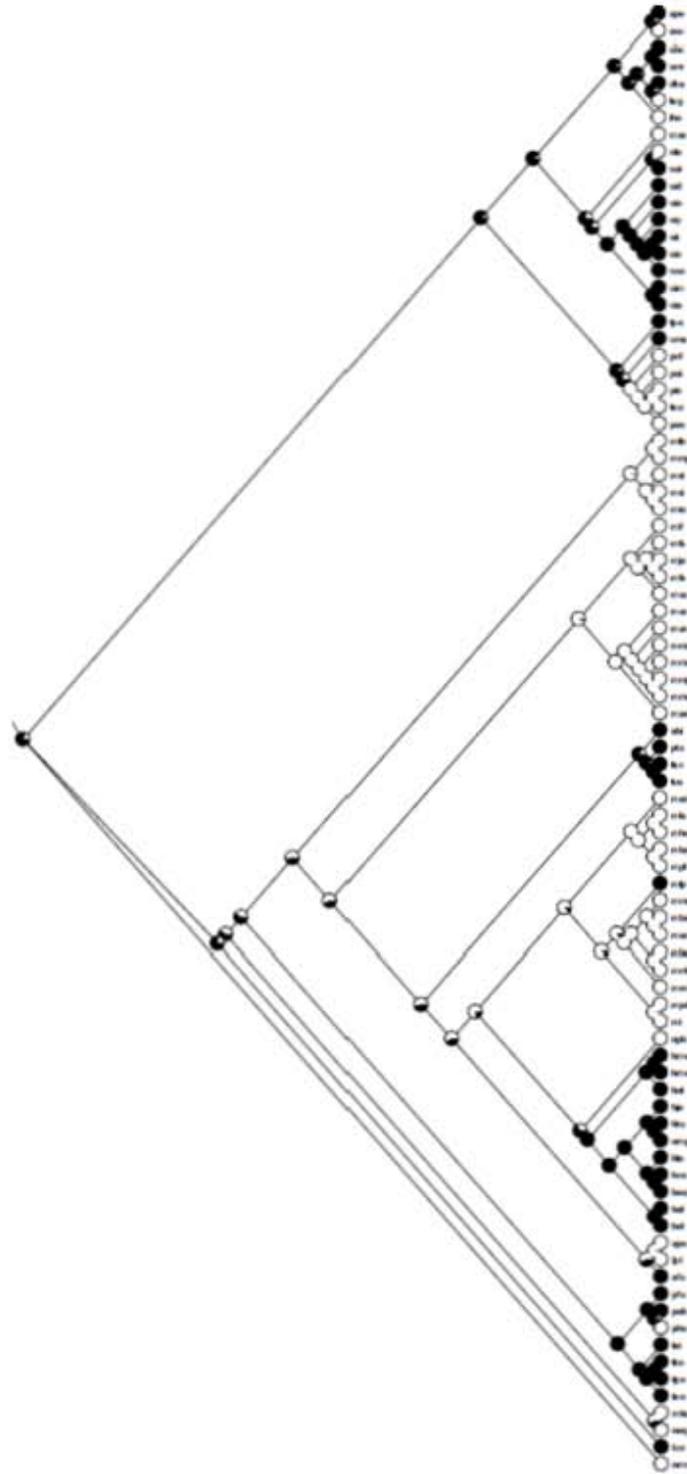
Werner F. 2007. Structure and function of archaeal RNA polymerases. *Mol. Microbiol.* 65: 1395:1404.

Woese CR, Fox GE. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74: 5088-5090.

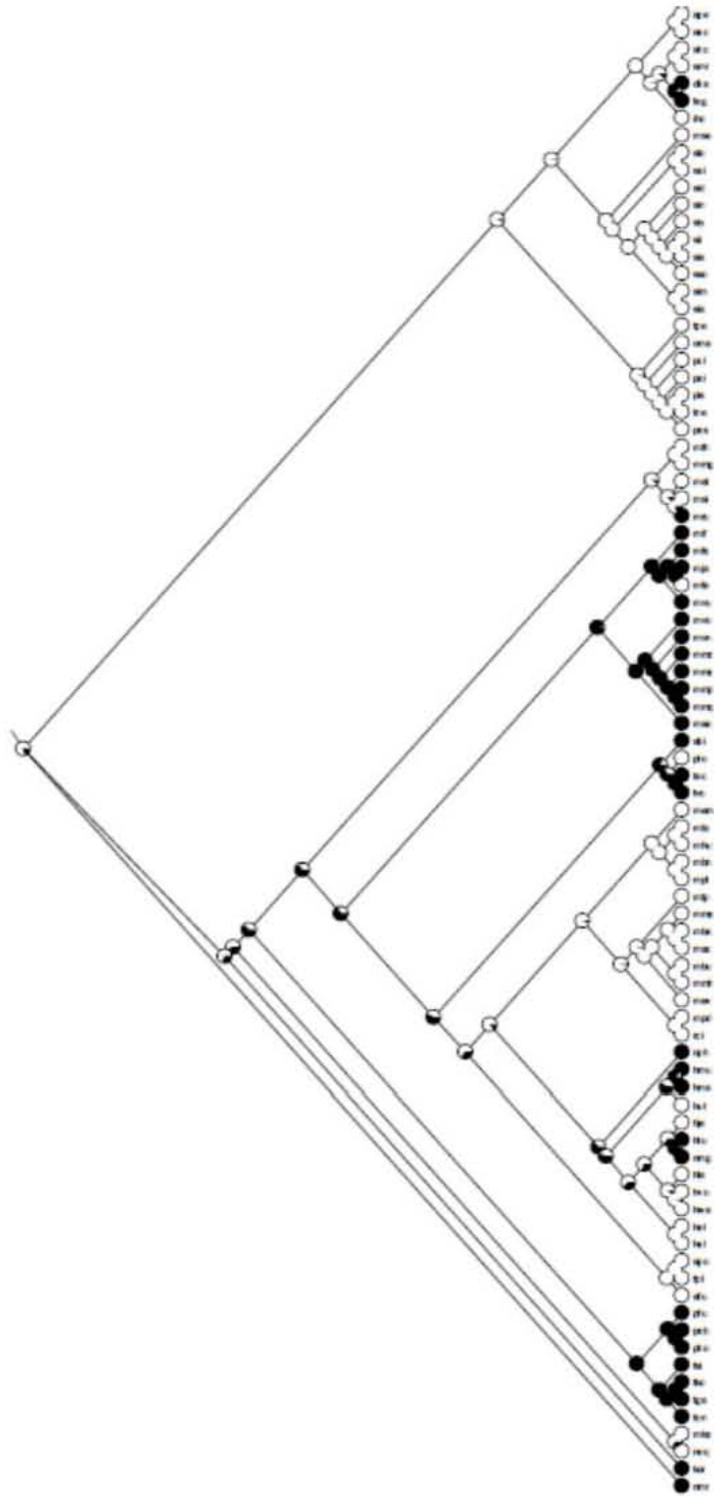
Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87: 4576-4579.

Woese CR. 1998. The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 6854-6859.

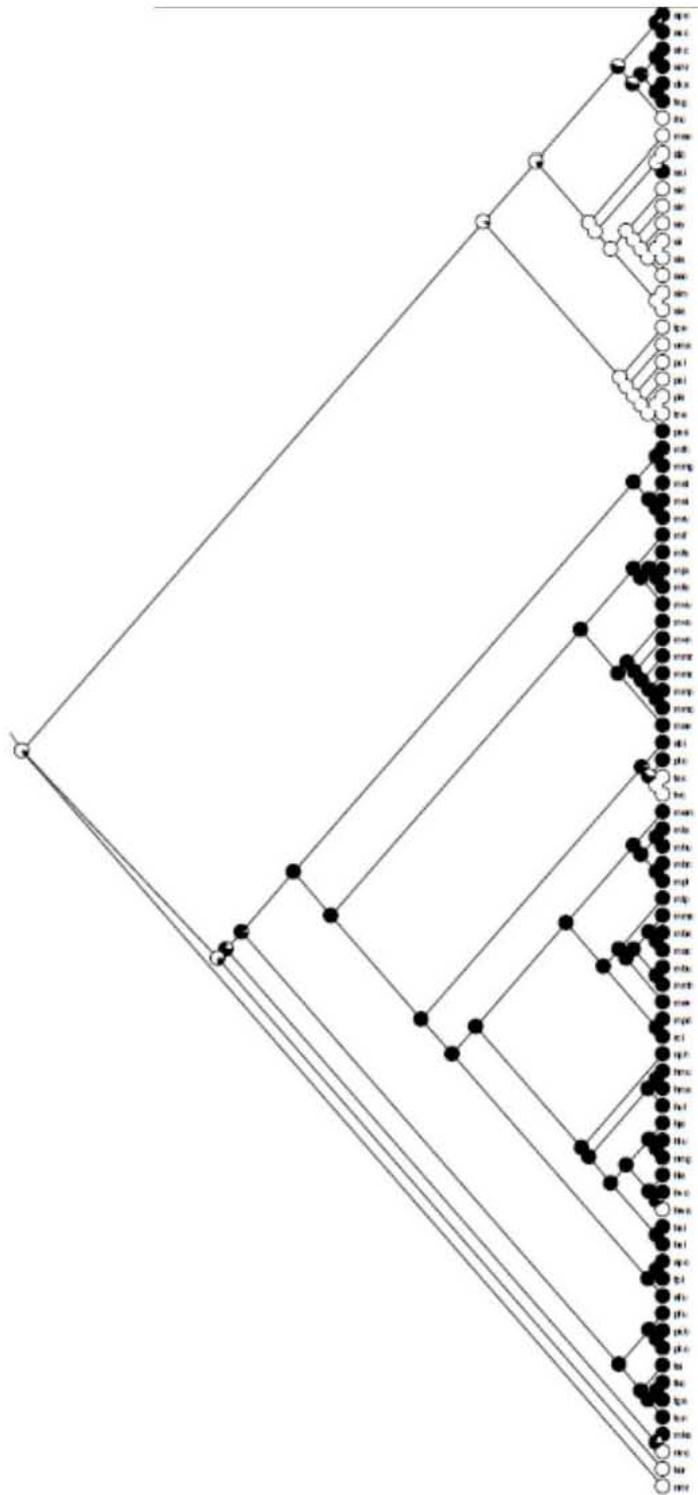
Yard BA, Carter LG, Johnson KA, *et al.* (12 coautores). 2007. The structure of serine palmitoyltransferase; gateway to sphingolipid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 307: 870-886.



Anexo 1a. Reconstrucción de Caracteres Ancestrales de la glicerol cinasa.



Anexo 1b. Reconstrucción de Caracteres Ancestrales de la serina palmitoil transferasa.



Anexo 1c. Reconstrucción de Caracteres Ancestrales de la esfingosina 1-fosfato liasa.