



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE LA GLUCONEOGÉNESIS EN LA
ARQUEA MARINA *Methanosarcina acetivorans***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

BIÓL. MICHEL GEOVANNI SANTIAGO MARTÍNEZ

TUTOR:

**DR. RICARDO JASSO CHÁVEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

MARZO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, bajo la dirección del Dr. Ricardo Jasso Chávez.

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Guillermo Gosset Largarda (Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez (Facultad de Medicina, UNAM)

Durante mis estudios de posgrado conté con una beca por parte de CONACyT (#280295). Además, el proyecto estuvo financiado por CONACyT (No. 156969, Dr. Ricardo Jasso Chávez).

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Jesús Adolfo García Sainz
Secretario	Dr. Ricardo Jasso Chávez
Vocal	Dr. Otto Geiger
Vocal	Dra. Valeria Souza Saldivar
Vocal	Dr. Diego González Halphen

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURAS.....	5

PARTE 1: La gluconeogénesis/glucólisis y el metabolismo del glucógeno en *Methanosarcina*

<i>acetivorans</i>	6
1. 1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1.1. Ecología e importancia de los organismos metanogénicos.....	6
1.1.2. Metabolismo central en los organismos metanogénicos.....	8
1.1.2.1. Metanogénesis metilotrófica.....	10
1.1.2.2. Metanogénesis acetotrófica.....	16
1.1.2.3. Gluconeogénesis a partir de piruvato.....	19
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	24
1.3. HIPÓTESIS.....	26
1.4. OBJETIVOS.....	26
1.4.1. Objetivo general.....	26
1.4.2. Objetivos particulares.....	26
1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
1.6. RESULTADOS.....	29
1.6.1. Datos y artículo publicado.....	29
Artículo de investigación: The nutritional status of <i>Methanosarcina acetivorans</i> regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes.....	29
1.6.2. Datos no publicados.....	52
1.7. DISCUSIÓN GENERAL.....	67
1.8. CONCLUSIONES.....	73

PARTE 2: Regulación de la actividad de ADP-PFK1 y FruBPasa II en el flujo

gluconeogénico y glucolítico de <i>Methanosarcina acetivorans</i>	74
2. 1. INTRODUCCIÓN.....	74
2.1.1. Características generales y función de la PFK1 y FruBPasa en el metabolismo de carbohidratos en microorganismos.....	74
2.1.2. Función de la ADP-PFK1 y FruBPasa en el metabolismo de <i>Methanosarcina acetivorans</i>	78

2.2. RESULTADOS	79
Artículo de investigación: Regulatory role of ADP-PFK1 and FruBPase II on the gluconeogenesis/glycolysis fluxes in <i>Methanosarcina acetivorans</i> (en preparación)	80
III. PERSPECTIVAS	107
IV. REFERENCIAS	108
V. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS	114
VI. ANEXOS	115
6. 1. Métodos destacados.....	115
6.1.1. Medio de cultivo y crecimiento celular	115
6.1.2. Cuantificación de gas metano	117
6.1.3. Cuantificación de metanol remanente	119
6.1.4. Cuantificación del contenido intracelular de glucógeno	120
6.1.5. Elaboración de las fracciones citosólicas enriquecidas en condiciones anaeróbicas para la determinación de actividades enzimáticas	121
6.1.6. Determinación del contenido relativo de mRNA	122
6.1.7. Clonación y sobre-expresión heteróloga de enzimas recombinantes	123
6.1.7.1. Diseño de oligonucleótidos	123
6.1.7.2. Amplificación del gen por PCR utilizando la <i>Pfu</i> DNA polimerasa	125
6.1.7.3. Purificación del producto de PCR	125
6.1.8. Preparación de células competentes con calcio	126
6.1.9. Transformación de células competentes	127
6.1.10. Generación de anticuerpos	128
6.1.10.1. Preparación del antígeno y esquema de inmunización de la gallina	128
6.1.10.2. Purificación de los anticuerpos	129
6. 2. Otras publicaciones	131

RESUMEN

Los microorganismos metanogénicos pertenecen al Dominio *Archaea* y participan en la producción anaerobia de gas metano en el paso final de la cadena trófica para el reciclaje del carbono. En estos microorganismos, la metanogénesis es la vía principal de síntesis de ATP. Los *Methanosarcinales* utilizan el acetato, las aminas metiladas o el metanol para la duplicación celular, por lo que la síntesis de algunas macromoléculas complejas (carbohidratos, metanocondroitina, nucleótidos, etc.) se inicia a través de la gluconeogénesis y otras vías del metabolismo central que no han sido estudiadas. Debido a esto, el entendimiento general de las vías anabólicas es importante para favorecer la formación de la biomasa celular y así obtener un incremento en la velocidad de síntesis de metano. El análisis del genoma secuenciado de *Methanosarcina acetivorans*, una arquea de origen marino, indicó la existencia de genes hipotéticos que podrían codificar para enzimas involucradas en la vía gluconeogénica, glucolítica y el metabolismo del glucógeno. Con análisis genómicos se ha propuesto que no todos los microorganismos metanogénicos tienen la capacidad de almacenar glucógeno ni de degradarlo, debido a la ausencia de algunos genes involucrados en estas vías metabólicas, por ejemplo, la fosfofructocinasa (*pfk*), la glucógeno sintasa (*gys*) y la glucógeno fosforilasa (*gyp*); sin embargo, su función no ha sido evaluada.

El objetivo de este proyecto fue la caracterización de la estructura, la función y la regulación de la vía de la gluconeogénesis, la síntesis y la degradación del glucógeno y la glucólisis en *Methanosarcina acetivorans*. Para esto, en células cultivadas durante 20 horas (fase exponencial de crecimiento = gluconeogénesis) o 60 horas de cultivo (fase estacionaria de crecimiento = glucólisis) se determinó la actividad de cada una de las enzimas y los flujos metabólicos en condiciones de pH y temperatura cercanas a las fisiológicas, así como la concentración intracelular de los intermediarios metabólicos involucrados en estas vías. Además, se determinó el nivel de mRNA y la modulación de la actividad de las enzimas que mostraron un cambio drástico en su velocidad inicial, tales como, la fructosa 1,6-Bisfosfatasa (FruBPasa), fosfofructocinasa 1 dependiente de ADP (ADP-PFK1), piruvato cinasa (PYK) y piruvato fosfato dicinasa (PPDK). Se determinó un

aumento en la actividad de PPDK, FruBPasa y GYS en células de 20 h *versus* 60 h de cultivo, el cual coincidió con un contenido mayor de sus transcritos y con la presencia de flujo gluconeogénico. En contraste, el aumento en la actividad de PYK y GYP coincidió con un nivel mayor de transcritos y la presencia de flujo glucolítico en células de 60 horas; sin embargo, el contenido del transcrito para la ADP-PFK1 disminuyó solo 13% en 20 *versus* 60 horas, sugiriendo la participación de la regulación a nivel post-traducciona (enzima inactiva o degradada) y metabólico (inhibición). En concentraciones fisiológicas, el AMP y la eritrosa-4-fosfato inhibieron la actividad de la FruBPasa (96%) y la hexosa fosfato isomerasa (55%), respectivamente. En cambio, el ATP y el AMP inhibieron la velocidad de ADP-PFK1 y de la PYK. La inhibición de la actividad de estas enzimas podría tener una repercusión importante sobre el flujo gluconeogénico y glucolítico, respectivamente.

La disponibilidad de una fuente de carbono externa regula los flujos metabólicos, ya que la adición de 240 mM de metanol a células en fase exponencial de crecimiento mantuvo el flujo glucogénico y la actividad de FruBPasa. Además, no se detectó actividad de PYK, ADP-PFK1 ni la presencia de flujo glucolítico.

Los resultados sugieren que en *M. acetivorans* el estado nutricional de la célula regula, a nivel transcripcional y metabólico, el flujo gluconeogénico/glucolítico y al metabolismo del glucógeno. Adicionalmente a la expresión génica, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas y la inhibición metabólica podrían proveer una regulación de los flujos metabólicos a mediano y corto plazo para mantener la homeostasis celular.

ABSTRACT

Methane producing microorganisms belong to the *Archaea* Domain. Methanogenic microorganisms are important because their ecological function, unique biochemical features and potential biotechnological applications. The biological methane production has an important role in the regulation of global carbon cycle because it marks the final step of the anaerobic trophic chain for the recycling of carbon components from organic matter. Also, methanogenic microorganisms are biotechnologically employed in the production of biogas (methane) in wastewater treatment and biogas plants and are thus involved in the alternative generation of renewable energy sources. Methanogenesis is the main pathway for ATP production in methanogenic microorganisms. However, there are other necessary pathways of the carbon central metabolism for cellular growth and which have not been fully investigated. *Methanosarcinales* utilize acetate or methyl groups deriving from methylated amines, sulfides or methanol for cellular growth and ATP supply; therefore, the complex macromolecules synthesis (e.g. carbohydrates, methanocondroitin, nucleotides, etc.) comes from gluconeogenesis. Because of this, the overall understanding of anabolic pathways and their physiological role are important for the increment in the cellular biomass formation, the velocity of methane synthesis and other biotechnological processes. The genomic analysis of *Methanosarcina acetivorans*, a methanogen isolated from the marine sediment, indicated the existence of putative genes that could encode enzymes involved in the gluconeogenic and glycolytic pathways as well as glycogen metabolism. In addition, all methanogens do not have the ability to store or degrade glycogen due to the absence of some genes involved in these metabolic pathways, for example, phosphofructokinase (*pfk*), glycogen synthase (*gys*) and glycogen phosphorylase (*gyp*); however, their function and physiological role have not been evaluated.

The main aim of this project was the characterization of the structure, function and regulation of the gluconeogenesis, glycogen synthesis and degradation, as well as glycolysis pathways in *Methanosarcina acetivorans*. In cells harvested at 20 hours or 60 hours of culture (gluconeogenesis = exponential or glycolysis = stationary phase of growth, respectively) the activities of each enzyme and the metabolic fluxes were determined at physiological conditions of temperature and pH. Also, the metabolite intracellular

concentrations involved in these pathways were determined. Additionally, the mRNA content and the metabolic regulation of fructose 1,6-bisphosphatase (FruBPase), ADP-dependent phosphofructokinase 1 (ADP-PFK1), pyruvate kinase (PYK) and pyruvate phosphate dikinase (PPDK) were analyzed, because these enzymes showed changes on their activity.

There was an increment of PPDK, FruBPase and GYS activities in cells grown during 20 hours which agrees with a higher mRNA content and the exclusive presence of a gluconeogenic flux. Instead, an increase of the PYK and GYP activities was determined in cells grown during 60 hours in agreement with a higher mRNA content and the exclusive presence of a glycolytic flux. However, mRNA content of ADP-PFK1 decreased only 13% in cells of 20 *versus* 60 hours suggesting the regulation post-translational (inactive or damaged protein) and metabolic inhibition. At physiological concentrations, AMP and erythrose 4-phosphate inhibited the FruBPase (96%) and hexose phosphate isomerase (55%) activity, respectively. Also, ATP and AMP inhibited the ADP-PFK1 and PYK activities. Enzyme inhibition could have a significant role on the regulation the gluconeogenic or glycolytic flux.

Also, the external carbon source availability regulates the metabolic fluxes. The addition of methanol (240 mM) to cells at exponential phase maintained the gluconeogenic flux and the FruBPase activity, but not PYK and ADP-PFK1 activities neither a glycolytic flux were detected.

These results suggested that in *Methanosarcina acetivorans* the cellular nutritional status regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes. In addition to gene expression, post-translational modifications of proteins and their metabolic inhibition could provide medium- and short-term regulation of metabolic fluxes to maintain the cellular homeostasis.

ABREVIATURAS

AcK, acetato cinasa

ADP, difosfato de adenosina

ALDO, fructosa 1,6 bisfosfato aldolasa

AMP, monofosfato de adenosina

ATP, trifosfato de adenosina

CODH/AcS, complejo monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintetasa

CoASH, coenzima A

DHAP, dihidroxiacetona fosfato

DTNB, 5, 5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)

DTT, ditioneitol

Fru1,6BP, fructosa-1,6-bisfosfato

FruBPasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa

Fru6P, fructosa-6-fosfato

GAPDH, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GAPOR, gliceraldehido-3-fosfato ferredoxina oxidoreductasa

G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GAPN, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante

α GPDH, α -glicerofosfato deshidrogenasa

GYP, glucógeno fosforilasa

GYS, glucógeno sintasa

HK, hexocinasa

HPI, hexosa-6-fosfato isomerasa

LDH, L-lactato deshidrogenasa

PEP, fosfoenolpiruvato

PEPS, fosfoenolpiruvato sintasa

Pyr, piruvato

PFK1, fosfofructocinasa 1

Pta, fosfotransacetilasa

PFOR, piruvato: ferredoxina oxidoreductasa

Pi, ortofosfato o fosfato inorgánico

PPDK, piruvato fosfato dicinasa

PPi, pirofosfato inorgánico

Pyr, piruvato

PYK, piruvato cinasa

PARTE 1: La gluconeogénesis/glucólisis y el metabolismo del glucógeno en *Methanosarcina acetivorans*.

1. 1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Ecología e importancia de los organismos metanogénicos

En 1990, el Dominio *Archaea* fue propuesto como un tercer grupo filogenético de la vida, separado de los Dominios *Bacteria* y *Eukarya*. Dicha clasificación se basó en las diferencias genéticas encontradas en la secuencia del RNA ribosomal de la subunidad menor (16S). Además, se propuso que estos grupos taxonómicos se desarrollaron por separado a partir de un progenitor común llamado progenota o protobionte (Woese *et al.*, 1990).

El Dominio *Archaea* es un grupo filogenético muy interesante debido a que muchas de sus especies participan en los ciclos biogeoquímicos y algunas otras especies tienen aplicaciones biotecnológicas. Cada vez hay un número mayor de especies que pueden ser cultivadas de manera axénica a pesar de que se requiere de condiciones de cultivo extremas para su crecimiento, tales como la anaerobiosis, temperaturas altas (60-98° C), pH extremo (2-5 a 8.5-10) o salinidad extrema (> 2 M de NaCl) (Kletzin, 2007).

El Dominio *Archaea* posee características bioquímicas y moleculares que las distinguen de *Bacteria* y de *Eukarya*, por ejemplo, algunas especies tienen una composición inusual de su pared celular (ausencia de peptidoglucano canónico) así como en la estructura (enlaces tipo éter) y la variedad de los lípidos que conforman su membrana celular, el complejo de la RNA polimerasa es estructuralmente diferente (11-13 subunidades) aunque es el responsable de la síntesis de todos los tipos de RNA como en *Bacteria*, entre otras

características. Además, las arqueas suelen utilizar algunas rutas metabólicas no clásicas dependiendo de las condiciones de cultivo o pueden ser únicas como la vía de la metanogénesis. Estas características inusuales permiten que muchas arqueas puedan ser propuestas para su uso en procesos industriales, por ejemplo, para la obtención de proteínas y compuestos resistentes a temperaturas altas o cambios drásticos de pH (Kletzin, 2007).

El Dominio *Archaea* está clasificado en seis *phyla*: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Korarchaeota*, y recientemente se ha propuesto a *Aigarchaeota*. El *Phylum Euryarchaeota* es el grupo más grande y diverso, ya que comprende a todos los organismos metanogénicos, los halófilos extremos y algunos termoacidófilos e hiper-termófilos, mientras que el *Phylum Crenarchaeota* comprende solo algunas especies hiper-termófilas. El resto de los *phyla* comprenden pocas especies caracterizadas y cultivadas de manera axénica (Bräsen *et al.*, 2014).


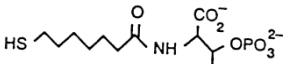
Dentro del *Phylum Euryarchaeota* se encuentran los microorganismos productores de gas metano o metanogénicos, los cuales son estrictamente anaerobios y habitan en ambientes diversos, tales como los sedimentos marinos y lacustres, arrozales, el tracto digestivo de animales rumiantes y termitas, así como en biodigestores y en algunas plantas de tratamiento de aguas residuales (Welte & Deppenmeier, 2013). Estos organismos son de importancia ecológica debido a que la producción anaerobia de gas metano es el paso final de la cadena trófica para el reciclaje del carbono a partir de la materia orgánica. El metano producido biológicamente es liberado a la atmósfera y a pesar de que su concentración es más baja que la concentración de dióxido de carbono (CO₂). Éste gas de efecto invernadero contribuye de manera considerable al calentamiento global debido a que posee 21 veces más poder calorífico (Welte & Deppenmeier, 2013). Actualmente, muchos metanogénicos son empleados en la producción de biogás (metano) en biodigestores y en plantas de

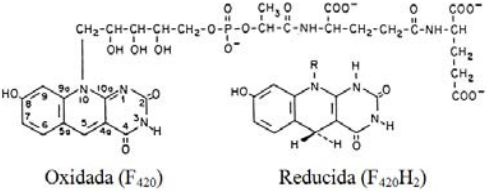
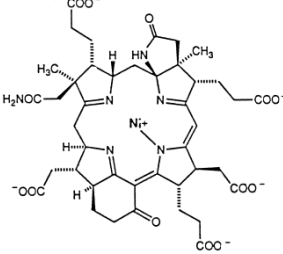
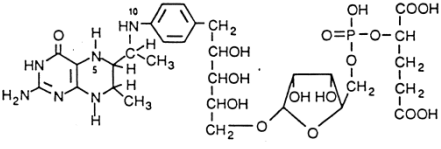
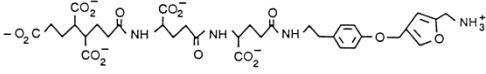
tratamiento de residuos. Debido a esto, resulta relevante conocer y comprender cómo funciona y cómo se regula el metabolismo central de los microorganismos metanogénicos. Estas aportaciones podrían ser útiles para obtener un beneficio mayor en la velocidad de síntesis de biogás y que éste pueda ser utilizado como una fuente de energía renovable.

1.1.2. Metabolismo central en los organismos metanogénicos

En los microorganismos metanogénicos, el ATP se sintetiza principalmente por medio de un mecanismo quimiosmótico a través de la metanogénesis. Esta vía metabólica es una cadena transportadora de electrones en la cual se genera un gradiente electroquímico de Na^+ / H^+ que es utilizado para la síntesis de ATP, y el gas metano se genera como un producto secundario (Welte & Deppenmeier, 2013). En la vía metanogénica se utilizan algunas coenzimas y cofactores muy particulares, cuya estructura y función general se muestran en la Tabla 1. Estas moléculas suelen tener algunas características estructurales que varían entre las distintas especies de metanogénicos (Deppenmeier, 2002).

Tabla 1. Estructura y función de coenzimas y cofactores involucrados en la metanogénesis de *Methanosarcina acetivorans*

Nombre	Estructura	Función
Coenzima M (CoMSH) 2-mercaptoetanosulfonato		Esencial para las reacciones de transferencia del grupo metilo. La HS-CoB reacciona con el Metil-S-CoM para generar metano y CoM-S-S-CoB en el paso final de la metanogénesis.
Coenzima B (CoBSH) 7-mercapto heptanoil-L-treonina fosfato		Acarreador de electrones.

<p>Coenzima F₄₂₀ 8-hidroxi-5-deazaflavina</p>	 <p>Oxidada (F₄₂₀) Reducida (F₄₂₀H₂)</p>	<p>Acarreador de electrones en metanogénesis a partir de metanol.</p>
<p>Cofactor F₄₃₀</p>		<p>Este cofactor es el grupo prostético de la metil-CoM-reductasa (Mcr), la cual cataliza la formación de metano y CoB-S-S-CoM en el paso final de la metanogénesis.</p>
<p>THMPT 5,6,7,8-tetrahidro-metanopterina</p>		<p>Acarreador de moléculas simples de carbono, comúnmente, en la transferencia del grupo metilo, metileno, metenilo y formilo.</p>
<p>Metanofurano</p>		<p>Funciona como un acarreador de moléculas simples de carbono, por ejemplo, en la reacción catalizada por la formilmetanofurano: THMPT formiltransferasa (Ftr)</p>

Basado en: Ferry (1999) y Deppenmeier (2002).

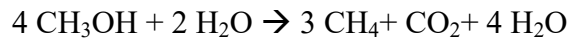
La metanogénesis es una característica presente en todos los microorganismos metanogénicos y se han descrito tres vías principales: metilotrófica, acetotrófica e hidrogenotrófica. Los metanogénicos metilotróficos utilizan el grupo metilo proveniente de las aminas o los sulfuros metilados o del metanol. Los acetoclásticos obtienen energía al metabolizar el acetato y los hidrogenotróficos usan el H₂ + CO₂. Además, existen algunas variaciones de estas vías que dependen de la especie estudiada. Por ejemplo, se ha descrito una vía de conversión de monóxido de carbono (CO) a CH₄ y CO₂ en *M. acetivorans* (Lessner *et al.*, 2006). Todas las vías metanogénicas conllevan a la formación

del heterodisulfuro (CoM-S-S-CoB) como el aceptor final de electrones y la generación de equivalentes reductores, tales como el $F_{420}H_2$, la ferredoxina reducida (Fd_{red}) o el H_2 , dependiendo de la especie.

A continuación se describe brevemente la metanogénesis metilotrónica y la metanogénesis acetoclástica que han sido descritas en *M. acetivorans*. La metanogénesis hidrogenotrónica no forma parte de este trabajo, debido a que nuestro modelo de estudio no tiene la capacidad de utilizar esta vía metabólica (Lessner *et al.*, 2006; Ferry, 2015).

1.1.2.1. Metanogénesis metilotrónica

Los miembros del género *Methanosarcina* pueden crecer en compuestos de un carbono, tales como el metanol y las metil-aminas, en la ausencia de H_2 . La ecuación general de la vía a partir de metanol es la siguiente:



($\Delta G^{\circ} = -106.5 \text{ kJ/mol CH}_4$) (Thauer, 1998).

En la metanogénesis a partir de metanol (Esquema 1), el grupo metilo (CH_3-) es sustrato de la metanol: coenzima M metiltransferasa (Mta), una enzima citosólica que cataliza la transferencia del grupo metilo a la coenzima M (2-mercaptoetanosulfonato, CoMSH). Una tercera parte de los grupos metilo son oxidados para generar los equivalentes reductores necesarios para la síntesis de metano. En la parte oxidativa de la metanogénesis, el grupo metilo es transferido de la CH_3-CoM a la tetrahidrometanosarcinopterinina (THMPT, un acarreador de grupos metilo). En esta reacción endergónica ($\Delta G^{\circ} = +30 \text{ kJ/mol CH}_4$), la enzima membranal metil-THMPT: coenzima M metiltransferasa (Mtr)

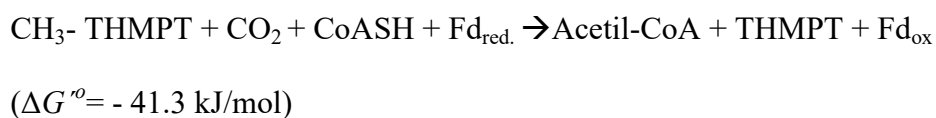
acopla la reacción de transferencia con la importación hacia el citosol de dos iones de Na^+ a través de la membrana plasmática para favorecer la catálisis. Una parte de este gradiente electroquímico de iones de sodio es transformado a un gradiente de H^+ por un antiportador Na^+/H^+ (Jasso-Chávez *et al.*, 2013) el cual es usado para la síntesis de ATP por la A_1A_0 ATP sintasa (Schelgel *et al.*, 2012). También, el complejo enzimático Rnf participa en el mantenimiento del estado redox de la célula regulando los niveles de $\text{Fd}_{\text{ox}}/\text{Fd}_{\text{red}}$ y generando un gradiente electroquímico de iones de sodio; aunque este complejo es sintetizado preferencialmente en células cultivadas en acetato, no se descarta su función en células cultivadas en metanol (Suhartiet *al.*, 2014). Posteriormente, el grupo metilo unido a la THMPT es oxidado a formil-THMPT con la generación concomitante de equivalentes reductores usados para la reducción del F_{420} ($E^{\circ\prime} = -360$ mV). Después de la transferencia del grupo formilo al metanofurano (MFR), la formil-MFR deshidrogenasa (Fmd) cataliza la oxidación a CO_2 y MFR ($\Delta G^{\circ\prime} = -16$ kJ/mol CH_4 , $E^{\circ\prime} = -530$ mV). En este paso, los electrones son transferidos a la ferredoxina (Fd) formando ferredoxina reducida (Fd_{red} , $E^{\circ\prime} = -500$ mV). En resumen, la oxidación del grupo metilo a CO_2 provee de cofactores reducidos ($2\text{F}_{420}\text{H}_2$ y 2Fd_{red}). A su vez, la conversión de CO_2 a HCO_3^- (no permeable a la membrana) catalizada por la anhidrasa carbónica (Cam) que está localizada en el exterior de la membrana celular podría facilitar la remoción de CO_2 del citoplasma y favorecer la síntesis de metano, como se ha propuesto para *Methanosarcina thermophila* (Alber & Ferry, 1994). En la parte reductiva de la vía, tres de las cuatro moléculas de grupos metilo son reducidas por la metil-CoMSH reductasa dependiente de CoBSH (Mcr, $\Delta G^{\circ\prime} = -45$ kJ/mol CH_4) a tres moléculas de CH_4 y tres moléculas de heterodisulfuro (CoM-S-S-CoB). Este último funciona como un aceptor final de electrones. Finalmente, la heterodisulfuro reductasa

(Hdr) cataliza la reducción del heterodisulfuro a CoMSH y CoBSH con la generación de un gradiente de H⁺ (Welte & Deppenmeier, 2014).

Durante la dilucidación de la vía metilotrófica en *Methanosarcina barkeri* mediante estudios de incorporación de ¹⁴[C]H₃OH, se encontró que la generación de metano y los precursores biosintéticos tienen algunos intermediarios en común, ya que el ¹⁴[C] se incorporó principalmente en el grupo metilo del piruvato, el cual proviene del acetyl-CoA y previamente del grupo metilo unido a una molécula acarreadora (CH₃-THMPT). Asimismo, se propuso que la síntesis de intermediarios celulares de dos carbonos se lleva a cabo por la condensación de dos compuestos de un carbono (un grupo metilo y una molécula de CO), y que probablemente la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) es la responsable de catalizar esta reacción química (Kenealy & Zeikus, 1982).

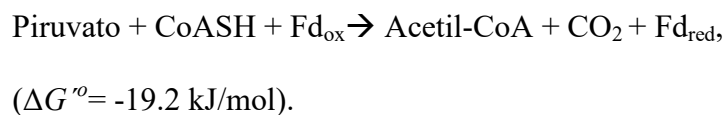
En el genoma secuenciado de *Methanosarcina acetivorans* se han encontrado dos copias del operón (Genes MA1012-MA1016 y MA3860-MA3865) que codifica para cada una de las subunidades de un complejo enzimático llamado monóxido de carbono deshidrogenasa/acetyl-CoA sintasa (CODH/AcS) (Galagan *et al.*, 2002). Ambos operones se expresan en células cultivadas en fuentes de carbono diferentes, sin embargo, no se ha explicado ni demostrado una diferencia en la función global de las proteínas sintetizadas (Li *et al.*, 2007).

Este complejo enzimático podría llevar a cabo la reacción en ambos sentidos, sin embargo, en células cultivadas con metanol la reacción que cataliza preferencialmente es la siguiente (Thauer, 1998):



Por medio de un análisis comparativo de transcriptómica y proteómica, Li *et al*, (2007) determinaron una proporción de 0.1 en el nivel del transcrito de estos genes en células cultivadas en metanol respecto a las cultivadas en acetato y de 0.004-0.1 en la abundancia de estas proteínas (metanol/acetato). Este resultado sugiere que a pesar de tener una relación de abundancia más baja que los cultivos con acetato, en las células cultivadas en metanol, la CODH/AcS está presente y podría ser el complejo enzimático responsable de la síntesis de acetil-CoA a partir del CH₃-THMPT, el CO₂ y la Fd_{red}, tal como se ha demostrado en la bacteria autotrófica y homoacetogénica *Clostridium thermoaceticum* (Ghambeer *et al*, 1971).

Por otra parte, Kenealy & Zeikus (1982) propusieron que el piruvato es sintetizado a partir del acetil-CoA proveniente del ¹⁴[C]H₃OH por una enzima piruvato sintasa hipotética. En algunas bacterias anaerobias (*Clostridium* spp.) y parásitos (*Entamoeba histolytica*), la enzima piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) cataliza la descarboxilación del piruvato a acetil-CoA y CO₂ (Thauer *et al.*, 1977; Dandekar *et al.*, 1999), mediante la siguiente reacción química:



La reacción reversa, es decir, la carboxilación del acetil-CoA, es importante en organismos acetogénicos que fijan CO₂ por la vía Wood-Ljungdahl (Furdui & Ragsdale, 2000). El análisis de los genomas secuenciados muestra que los genes que podrían codificar para esta proteína se encuentran en todos los metanogénicos. En *Methanosarcina barkeri* se ha sugerido la participación de la PFOR en la síntesis de piruvato a partir de acetil-CoA y el uso de la ferredoxina como aceptor/donador de electrones (Book *et al.*, 1996). En el

genoma secuenciado de *Methanosarcina acetivorans* se han encontrado los genes (MA0031-0034) que podrían codificar para las cuatro subunidades de la PFOR (Galagan *et al.*, 2002) y mediante un análisis de proteómica se ha determinado que la abundancia de la proteína codificada por el gen MA0034 (probable subunidad gama) se encuentra en una proporción <0.25 si su nivel es comparado en las células cultivadas en acetato *versus* metanol (Li *et al.*, 2004); sin embargo, no se ha demostrado ni la síntesis ni la función de todo el complejo enzimático.

Una forma de regular la dirección de la reacción que cataliza la PFOR es mediante el uso de un aceptor de electrones con un potencial redox alto en la dirección oxidativa y un donador con potencial bajo en la dirección reductiva, así como la concentración intracelular de los sustratos y productos de la reacción. Se ha propuesto a la ferredoxina reducida (Fd_{red} $E^{0'} = -500$ mV) como el donador de electrones fisiológico que le da la dirección a la reacción (Furdui & Ragsdale, 2000), favoreciendo la síntesis de piruvato a partir del acetil-CoA y una molécula de CO_2 o HCO_3^- .

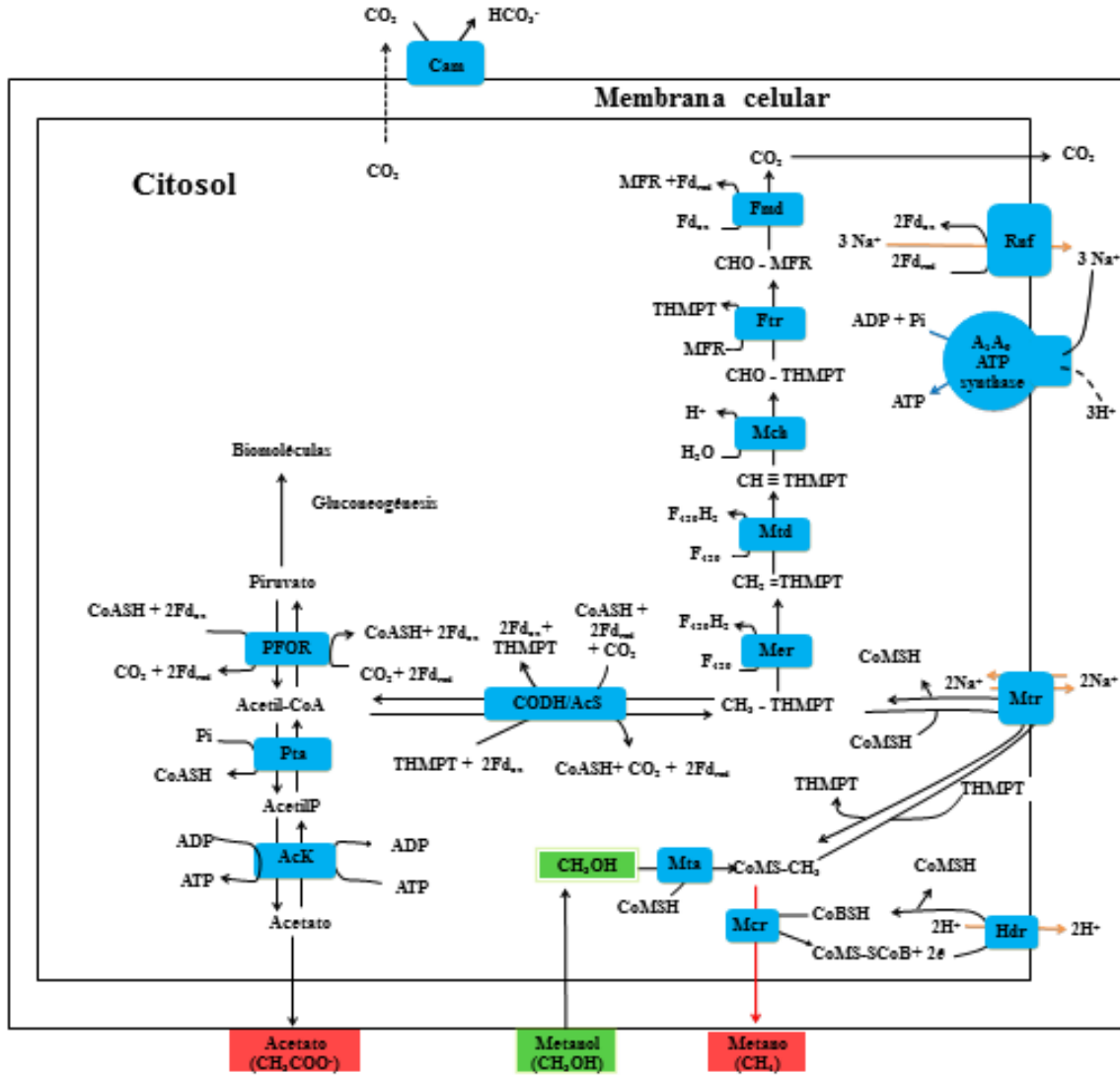
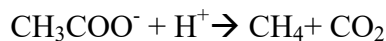


Figura 1. Metanogénesis a partir de metanol en *Methanosarcina acetivorans*. Los grupos metilo provenientes del metanol u otros compuestos metilados (metil-, dimetil- y trimetil-amina) entran a la vía metanogénica al unirse a la CoMSH. Una tercera parte de los grupos metilo son oxidados hasta CO₂ para generar los equivalentes reductores necesarios para la producción de metano (2 F₄₂₀H₂ y 2 Fd_{red} por cada grupo metilo). En la parte reductiva de la vía, tres de las cuatro moléculas con grupos metilo son reducidas por la Mcr dependiente de CoBSH a tres moléculas de CH₄ y tres moléculas de heterodisulfuro (CoM-S-S-CoB), el cual funciona como un aceptor final de electrones en esta cadena respiratoria anaerobia. El gradiente electroquímico de Na⁺/H⁺ generado durante el transporte de electrones es usado para la síntesis de ATP por la A₁A₀ ATP sintasa. El complejo CODH/Acs sintetiza el acetil-CoA a partir del CH₃-THMPT, CO₂ y Fd_{red}. Posteriormente, la PFOR sintetiza el piruvato a partir de acetil-CoA, CO₂ y Fd_{red}. El piruvato es el sustrato de la gluconeogénesis para la síntesis de biomoléculas necesarias para la duplicación celular y, en algunas especies, para la síntesis de polisacáridos de reserva (glucógeno). Adicionalmente, la síntesis de acetato a

partir de acetilCoA conlleva la producción de ATP por fosforilación a nivel de sustrato por la Pta/AcK. Abreviaturas: **Mta**, metanol: coenzima M metiltransferasa; **Mtr**, metil-THMPT: coenzima M metiltransferasa; **Mer**, metileno-THMPT reductasa dependiente de F₄₂₀; **Mtd**, metileno-THMPT deshidrogenasa dependiente de F₄₂₀; **Mch**, metileno-THMPT ciclohrolasa; **Ftr**, formil-metanofurano: THMPT formil-transferasa; **Fmd**, formil-metanofurano deshidrogenasa; **Cam**, anhidrasa carbónica; **Mcr**, metil-CoM reductasa; **Hdr**, heterodisulfuro reductasa; **CODH/AcS**, complejo enzimático monóxido de carbono deshidrogenasa/acetilCoA sintasa; **PFOR**, piruvato: ferredoxina oxidoreductasa; **Pta**, fosfotransacetilasa; **AcK**, acetato cinasa; **THMPT**, 5,6,7,8-tetrahidrometanosarcinopterinina; **CH₃-**, grupo metilo-; **CH₂=**, grupo metileno; **CH≡**, grupo metenilo; **CHO-**, grupo formilo; **CO₂**, dióxido de carbono; **HCO₃⁻**, bicarbonato; **MFR**, metanofurano; **F₄₂₀**, coenzima 8-hidroxi-5-deazaflavina oxidada; **F₄₂₀H₂**, coenzima 8-hidroxi-5-deazaflavina reducida; **Fd_{ox}**, ferredoxina oxidada; **Fd_{red}**, ferredoxina reducida; **CoMSH**, coenzima M, 2-mercaptoetanosulfonato; **CoBSH**, coenzima B, 7-mercapto heptanoil-L-treonina fosfato; **CoM-S-S-CoB**, heterodisulfuro; **CH₄**, metano; **CoASH**, coenzima A; **ATP**, adenosín trifosfato; **ADP**, adenosín difosfato; **Pi**, fosfato inorgánico.

1.1.2.2. Metanogénesis acetotrófica

Los miembros del género *Methanosarcina* y *Methanosaeta* contienen a las especies conocidas que pueden crecer en acetato. La ecuación general de la vía es la siguiente:



($\Delta G^{\circ} = -36.5 \text{ kJ/mol CH}_4$) (Thauer, 1998).

En la metanogénesis acetoclástica de *Methanosarcina* spp. (Esquema 2), la conversión de acetato a CH₄ y CO₂ proporciona una ganancia energética muy pequeña para la célula debido a que se requiere del gasto de ATP para la síntesis del acetil-CoA. Este hecho sugiere la existencia de una regulación metabólica más estricta con la finalidad de maximizar la eficiencia termodinámica y la asimilación de carbono. En *Methanosarcina* spp., el acetato es fosforilado a acetil-fosfato en una reacción catalizada por la acetato cinasa (AcK), la cual requiere de la hidrólisis de un ATP. Posteriormente el grupo fosfato es sustituido por la coenzima A para la síntesis de acetil-CoA en una reacción catalizada por la fosfotransacetilasa (Pta) (Ferry, 2015). El acetil-CoA es sustrato del complejo

enzimático monóxido de carbono deshidrogenasa/acetilCoA sintasa (CODH/AcS) quien al romper los enlaces C-C y C-S de esta molécula permite que el grupo carbonilo sea oxidado a CO₂ y que dos electrones sean transferidos a la ferredoxina. El grupo metilo entra a la parte reductiva de la metanogénesis y es transferido a la THMPT. La metil-THMPT: coenzima M metiltransferasa (Mtr) unida a membrana actúa en la dirección reversa si se compara con la metanogénesis metilotrónica, lo cual indica que este es un centro de conservación de energía al generar un gradiente electroquímico de 2 Na⁺ por cada grupo metilo que es transferido a la CoMSH. Finalmente, el CH₄ es sintetizado por la metil-CoM reductasa (Mcr) con la concomitante producción del heterodisulfuro. En total, dos electrones son transferidos a la ferredoxina y una molécula de heterodisulfuro es formado por el catabolismo de una molécula de acetato. En este proceso, 2 Na⁺ por cada molécula de acetato contribuyen a la generación del gradiente electroquímico. De igual forma como sucede en la vía metilotrónica, una parte de este gradiente electroquímico de iones de Na⁺ es transformado a un gradiente de H⁺ por un antiportador Na⁺/H⁺ (Jasso-Chávez *et al.*, 2013) el cual es usado para la síntesis de ATP por la A₁A₀ ATP sintasa (Schelgel *et al.*, 2012). El complejo enzimático Rnf participa en el mantenimiento del estado redox de la célula regulando los niveles de Fd_{ox}/Fd_{red} y generando un gradiente electroquímico de iones de sodio (3Na⁺/2Fd_{red}) (Suharti *et al.*, 2014). Este complejo sustituye a la hidrogenasa de membrana (Ech) clásica de los acetotróficos cuyo crecimiento es dependiente de H₂ (Li *et al.*, 2006; Ferry, 2015). En *M. acetivorans*, los genes que codifican para las seis subunidades del complejo Rnf co-transcriben con el gen codificante para el Citocromo *c* (Cyt *c*), el cual se encuentra de manera abundante en las membranas de las células cultivadas en acetato. Un modelo de la topología del Rnf/Cyt *c* predice los papeles para cada uno de sus componentes y sugiere que la metanofenazina (MP) modula la

transferencia de electrones entre el Citocromo *c* y la Hdr, contribuyendo a la generación de un gradiente electroquímico de H^+ (Suharti *et al.*, 2014). La anhidrasa carbónica (Cam) localizada en el exterior de la membrana celular convierte el CO_2 a HCO_3^- (no permeable a la membrana), lo cual facilita la remoción de CO_2 del citoplasma y favorece la síntesis de gas metano (Alber & Ferry, 1994). Por último, la heterodisulfuro reductasa (Hdr) cataliza la reducción del heterodisulfuro a CoMSH y CoBSH con la generación de un gradiente de H^+ (Welte & Deppenmeier, 2013; Thauer, 1998).

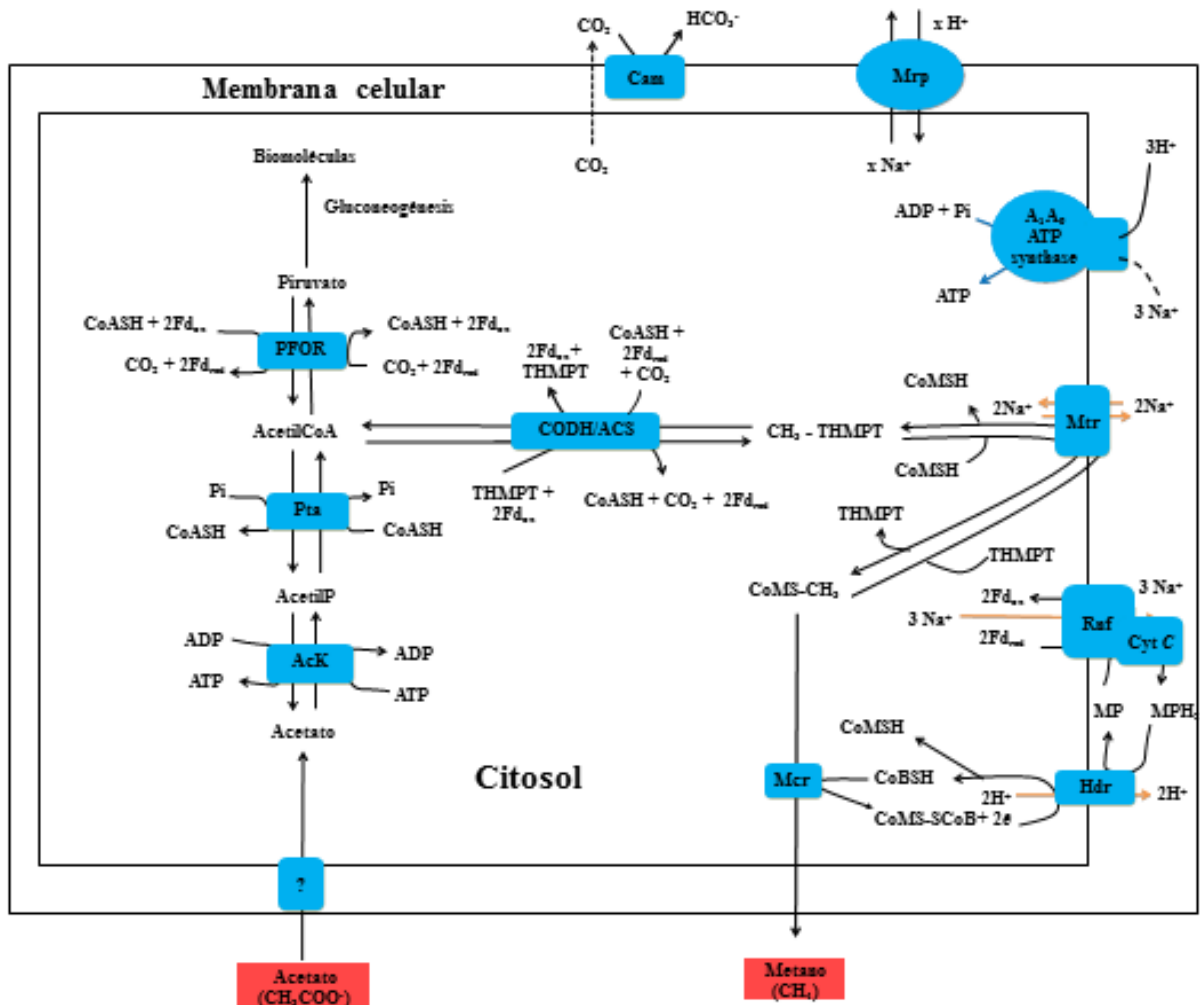


Figura 2. Metanogénesis a partir de acetato en *Methanosarcina acetivorans*. La síntesis de acetil-CoA a partir de acetato es catalizada por la Pta/AcK y requiere de la hidrólisis de un equivalente de ATP. El acetil-CoA es sustrato del complejo CODH/Acs quien permite que el grupo carbonilo sea oxidado a CO_2 y que dos

electrones sean transferidos a la ferredoxina. El grupo metilo entra a la parte reductiva de la metanogénesis y es transferido a la THMPT. La Mtr unida a membrana genera un gradiente electroquímico de 2Na^+ por cada grupo metilo que es transferido a la CoMSH. Finalmente, el CH_4 es sintetizado por la Mcr con la concomitante producción del heterodisulfuro. Una parte de este gradiente electroquímico de iones de Na^+ es transformado a un gradiente de H^+ por un antiportador Na^+/H^+ el cual es usado para la síntesis de ATP por la A_1A_0 ATP sintasa. El complejo Rnf/Cyt *c* participa en el mantenimiento del estado redox de la célula regulando los niveles de $\text{Fd}_{\text{ox}}/\text{Fd}_{\text{red}}$ y generando un gradiente electroquímico de Na^+ . La oxido-reducción de la metanofenazina (MP) contribuye a la generación de un gradiente electroquímico de H^+ por la Hdr. La anhidrasa carbónica (Cam) localizada en el exterior de la membrana celular convierte el CO_2 a HCO_3^- . Por otro lado, la PFOR sintetiza el piruvato a partir de acetyl-CoA, CO_2 y Fd_{red} . El piruvato es el sustrato de la gluconeogénesis para la síntesis de biomoléculas necesarias para la duplicación celular y, en algunas especies, para la síntesis de polisacáridos de reserva (glucógeno). En ausencia de fuente carbono externa, el glucógeno podría ser degradado a través de la glucólisis (*ver* Figura 3: Gluconeogénesis/glucolisis). Abreviaturas: **AcK**, acetato cinasa; **Pta**, fosfotransacetilasa; **CODH/AcS**, complejo enzimático monóxido de carbono deshidrogenasa/acetylCoA sintasa; **Mtr**, metil-THMPT: coenzima M metiltransferasa; **Mcr**, metil-CoM reductasa; **Hdr**, heterodisulfuro reductasa; **PFOR**, piruvato: ferredoxina oxidoreductasa; **Cam**, anhidrasa carbónica; **CoASH**, coenzima A; **ATP**, adenosín trifosfato; **ADP**, adenosín difosfato; **Pi**, fosfato inorgánico; **THMPT**, 5,6,7,8-tetrahidrometanosarcinopterinina; **CH₃-**, grupo metilo-; **CO₂**, dióxido de carbono; **HCO₃⁻**, bicarbonato; **Cyt c**, citocromo *c*membranal; **MF**, metanofenazina; **Fd_{ox}**, ferredoxina oxidada; **Fd_{red}**, ferredoxina reducida; **CoMSH**, coenzima M, 2-mercaptoetanosulfonato; **CoBSH**, coenzima B, 7-mercapto heptanoil-L-treonina fosfato; **CoM-S-S-CoB**, heterodisulfuro; **CH₄**, metano.

En los microorganismos metanogénicos metilotróficos y acetotróficos, la PFOR sintetiza el piruvato a partir del acetyl-CoA y este intermediario es utilizado en algunas vías anabólicas, como la gluconeogénesis, para la síntesis de macromoléculas necesarias para la duplicación celular y para la síntesis de polisacáridos de reserva.

1.1.2.3. Gluconeogénesis a partir de piruvato.

La gluconeogénesis es la ruta metabólica clásica de síntesis de glucosa a partir de compuestos que no son carbohidratos, principalmente del piruvato, lactato, algunos aminoácidos interconvertibles (alanina) e intermediarios del ciclo de los ácidos

tricarboxílicos (Nelson & Cox, 2017). En organismos que crecen en fuentes de carbono distintas a los azúcares, la gluconeogénesis es esencial para la generación de intermediarios biosintéticos. En eubacterias y células eucariontes, la síntesis de carbohidratos ocurre por actividad reversa de la vía clásica Embden-Meyerhof-Parnas; sin embargo, dos pasos enzimáticos irreversibles involucran enzimas alternas, las reacciones catalizadas por las enzimas piruvato cinasa (PYK) y la fosfofructocinasa 1 (PFK-1) dependiente de ATP y éstas varían dependiendo de la especie (Nelson & Cox, 2017). Por ejemplo: en la bacteria anaerobia *Clostridium symbiosum* y en el protista parásito *Entamoebahistolytica*, la piruvato fosfato dicinasa (PPDK) sustituye la función de la piruvato cinasa en la glucólisis y además puede llevar a cabo la reacción de síntesis de piruvato en la vía gluconeogénica (Reeves *et al.*, 1968). Por otro lado, en el arqueon hipertermófilo *Pyrococcus furiosus* se ha determinado que la enzima Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FruBPasa) sintetiza fructosa 6-fosfato a partir de fructosa 1,6-bisfosfato cuando este organismo es cultivado en un sustrato gluconeogénico (piruvato). Además, la actividad de esta enzima no es modulada por metabolitos clásicos ni presenta cooperatividad, como se ha demostrado en las FruBPasas de otros organismos (Schafer & Schönheit, 1993).

De manera general se ha establecido que la gluconeogénesis es una vía presente en todos los seres vivos y las reacciones son esencialmente las mismas, aunque en algunas especies suelen existir pequeñas diferencias en la estructura y la regulación de la actividad de las enzimas involucradas.

Las enzimas de la gluconeogénesis y la glucólisis han sido estudiadas en algunos organismos del Dominio *Archaea*, principalmente en microorganismos hipertermófilos que pueden ser cultivados en diferentes fuentes de carbono. En estas arqueas se ha determinado la actividad de algunas enzimas que participan en la síntesis y la degradación de

carbohidratos, así como la expresión de genes que codifican para algunas enzimas de la glucólisis y la gluconeogénesis con la finalidad de comparar su metabolismo cuando son cultivadas en carbohidratos (maltosa, almidón, celulosa o quitina) o en presencia de compuestos gluconeogénicos (aminoácidos/péptidos, piruvato o lactato) (Bräsen *et al.*, 2014); sin embargo, en los microorganismos metanogénicos no se conocen las enzimas involucradas, el contenido intracelular de los intermediarios ni los niveles de regulación de estas vías metabólicas.

En la Figura 3 se esquematiza de manera resumida a las vías descritas de síntesis y degradación de carbohidratos en algunos microorganismos hipertermófilos y halófilos, las cuales nos han permitido proponer la estructura general de la vía de la gluconeogénesis y la glucólisis en *Methanosarcina acetivorans*. Además, la estructura general de estas vías está basada en el análisis del genoma y se discute más adelante en el artículo.

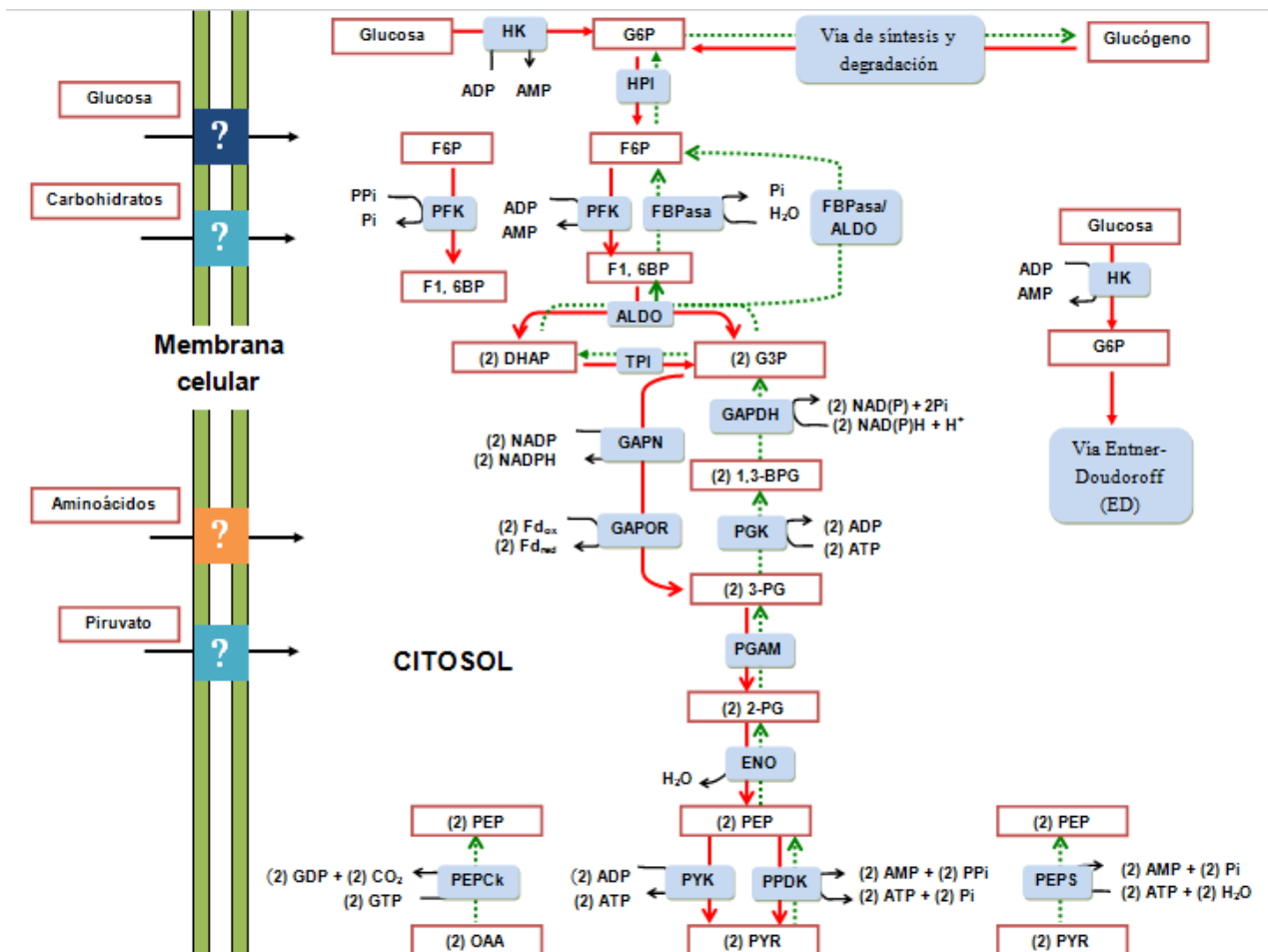


Figura 3. Esquema condensado de las vías de síntesis y degradación de glucosa en organismos del Dominio *Archaea*. En organismos hiper-termófilos o halófilos, la glucosa proveniente del exterior de la célula puede ser degradada mediante la vía Entner-Doudoroff (ED) o la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) modificada. La hexocinasa dependiente de ADP puede fosforilar a la glucosa para la formación de glucosa 6-fosfato, la cual puede ser utilizada para la síntesis de glucógeno o para la formación de fructosa 6-fosfato. La fosfofructocinasa dependiente de ADP o P_i puede sintetizar la fructosa 1,6-bisfosfato. La aldolasa rompe a esta molécula para sintetizar a la dihidroxiacetona fosfato y al gliceraldehído 3-fosfato. Este metabolito puede ser tomado por tres enzimas diferentes: la NADP⁺-GAPDH, la GAPN y la GAPOR. El sistema NAD(P)⁺-GAPDH/PGK implica la síntesis de ATP por fosforilación a nivel de sustrato. La GAPN y la GAPOR no conllevan la síntesis directa de ATP, sin embargo, contribuyen a la generación de equivalentes reductores (NADH, NADPH o ferredoxina reducida). La síntesis de piruvato a partir del fosfoenolpiruvato conlleva la síntesis de ATP y puede ser catalizada por la piruvato cinasa o la piruvato fosfato dicinasa. La síntesis de carbohidratos (gluconeogénesis) ocurre por actividad reversa de la vía clásica Embden-Meyerhof-Parnas; sin embargo, algunos pasos enzimáticos irreversibles involucran enzimas alternas. El fosfoenolpiruvato puede ser sintetizado a partir del piruvato en una reacción catalizada por la piruvato fosfato dicinasa o la

fosfoenolpiruvato sintetasa, la cual involucra el gasto de ATP. La fosfoenolpiruvato carboxicinasas puede sintetizar el fosfoenolpiruvato a partir del oxaloacetato y el GTP. La fructosa 6-fosfato puede ser sintetizada por una fructosa 1,6-bisfosfatasa a partir de la F1,6BP o por una enzima bifuncional (FBPasa/ALDO) a partir de la dihidroxiacetona fosfato y del gliceraldehído 3-fosfato. Hasta el momento, no se ha caracterizado ningún tipo de transportador celular para moléculas precursoras de la vía glucolítica o gluconeogénica. *Abreviaturas:* **HK**, hexocinasas; **HPI**, hexosa fosfato isomerasa; **PFK**; fosfofructocinasas; **FBPasa**, fructosa 1,6 bisfosfato fosfatasa; **ALDO**, aldolasa; **FBPasa/ALDO**; enzima bifuncional con actividad de fructosa 1,6-bisfosfatasa y aldolasa; **TPI**, triosafosfato isomerasa; **GAPDH**, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; **GAPN**, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante; **GAPOR**, gliceraldehído 3-fosfato: ferredoxina oxidoreductasa; **PGK**, fosfoglicerato cinasa; **PGAM**, fosfoglicerato mutasa; **ENO**, enolasa; **PYK**, piruvato cinasa; **PPDK**, piruvato fosfato dicinasas; **PEPS**, piruvato agua cinasa o fosfoenol piruvato sintetasa; **PEPCK**, fosfoenol piruvato carboxicinasas; **G6P**, glucosa 6-fosfato; **F6P**, fructosa 6-fosfato; **F1,6BP**, fructosa 1,6-bisfosfato; **DHA**, dihidroxiacetona fosfato; **G3P**, gliceraldehído 3-fosfato; **1,3BPG**, 1,3-bisfosfoglicerato; **3-PG**, 3-fosfoglicerato; **2-PG**, 2-fosfoglicerato; **PEP**, fosfoenolpiruvato; **PYR**, piruvato; **OAA**, oxaloacetato; **ADP**, adenosín difosfato; **AMP**, adenosín monofosfato; **PPi**, pirofosfato inorgánico; **Pi**, fosfato inorgánico; **Fd_{ox}**, ferredoxina oxidada; **Fd_{red}**, ferredoxina reducida; **NAD⁺**, nicotinamida adenina dinucleótido; **NADP⁺**, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **GTP**, guanosín trifosfato; **GDP**, guanosín difosfato; **CO₂**, dióxido de carbono.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Existen varias razones que podrían explicar por qué las vías de síntesis y degradación de carbohidratos no se han estudiado en organismos metanogénicos: i) el interés biotecnológico en la biosíntesis de metano ha dirigido la mayor parte de las investigaciones hacia el estudio de la metanogénesis a partir de sustratos diferentes. En estos estudios se pretende determinar experimentalmente la condición óptima de producción de biogás utilizando estrategias microbiológicas (probar sustratos metanogénicos nuevos), así como el uso de herramientas de Ingeniería de Vías Metabólicas para aumentar la velocidad de síntesis de este biocombustible (Wood, 2016); ii) la mayor parte de la fuente de carbono se utiliza para la metanogénesis y solo una parte muy pequeña es utilizada para las reacciones anabólicas.

Methanosarcina spp. consume alrededor del 90% de la fuente de carbono para la síntesis de ATP vía metanogénesis y el resto para la formación de biomasa, por lo que estos organismos requieren de una regulación estricta de las rutas biosintéticas para la asimilación eficiente del carbono y la conservación de energía (Ferry, 2015). Además, se ha reportado que *Methanococcus* spp. y *Methanlobus* spp. acumulan glucógeno (cerca al 0.34% del peso seco celular) en fase estacionaria temprana de crecimiento, cuando aún hay fuente de carbono exógena (formiato) y se ha propuesto que éste polisacárido sirve como un donador de electrones/carbono para la producción de metano cuando el sustrato exógeno se ha agotado (Konig *et al.*, 1985). Posiblemente, el glucógeno es consumido a través de la glucólisis, como sucede en las células eucariontes animales (Nelson & Cox, 2017). De ser así, la presencia de una vía gluconeogénica o una glucolítica depende de la fuente de carbono externa disponible y de las necesidades energéticas de las células; sin embargo, esta hipótesis no ha sido probada aún.

En el genoma de *Methanosarcina acetivorans* se han identificado genes que podrían codificar para enzimas requeridas tanto para una vía gluconeogénica y de síntesis de glucógeno como para una vía glucolítica (Galagan *et al.*, 2002), lo que sugiere una regulación estricta de estas vías con la finalidad de permitir una asimilación eficiente de la fuente de carbono y de energía.

La caracterización de la gluconeogénesis y la glucólisis en *Methanosarcina acetivorans*, así como conocer los mecanismos de regulación de estas vías permitirán contribuir en el conocimiento del metabolismo anabólico de microorganismos metanogénicos con gran importancia biotecnológica, ecológica y evolutiva, además de proponer los mecanismos que les permiten contender con algunas condiciones ambientales adversas, tales como el estrés nutricional o energético y la exposición a metales pesados u oxígeno, donde se requiere de la síntesis de *novo* de macromoléculas y de una biopelícula protectora (Lira-Silva *et al.*, 2016, Jasso-Chavéz *et al.*, 2015).

Por último, este enfoque experimental nos permitirá contribuir al entendimiento de los niveles diferentes de regulación del metabolismo de carbohidratos en arqueas, utilizando como ejemplo el estudio de proteínas claves en la glucólisis y la gluconeogénesis de *M. acetivorans*, las cuales en un futuro pueden ser modificadas o reemplazadas para aumentar la biomasa celular y la velocidad de síntesis de metano.

1.3. HIPÓTESIS

En *Methanosarcina acetivorans* la metanogénesis provee de intermediarios metabólicos que son utilizados para la vía gluconeogénica a través de enzimas de la vía Emden-Meyerhof-Parnas.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Caracterizar el metabolismo central de carbohidratos en el arqueón marino *Methanosarcina acetivorans*.

1.4.2. Objetivos particulares

- Determinar el consumo de la fuente de carbono (metanol) a través del tiempo de cultivo.
- Cuantificar la síntesis de metano a través del tiempo de cultivo.
- Determinar la actividad de las enzimas involucradas en la gluconeogénesis, la glucólisis y el metabolismo del glucógeno.
- Determinar el contenido intracelular de los intermediarios metabólicos involucrados en la gluconeogénesis, la glucólisis y el metabolismo del glucógeno.
- Determinar el flujo gluconeogénico y glucolítico.
- Evaluar el efecto de los moduladores clásicos sobre la actividad de las enzimas que regulan a estas vías metabólicas.
- Determinar del contenido de mRNA de genes que codifican para enzimas involucradas en la regulación de estas vías metabólicas.

1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el esquema siguiente se muestra la estrategia experimental general utilizada en este proyecto. Los métodos se detallan en el artículo publicado (sección: *Experimental procedures*) y en la sección VI de anexos de este trabajo.

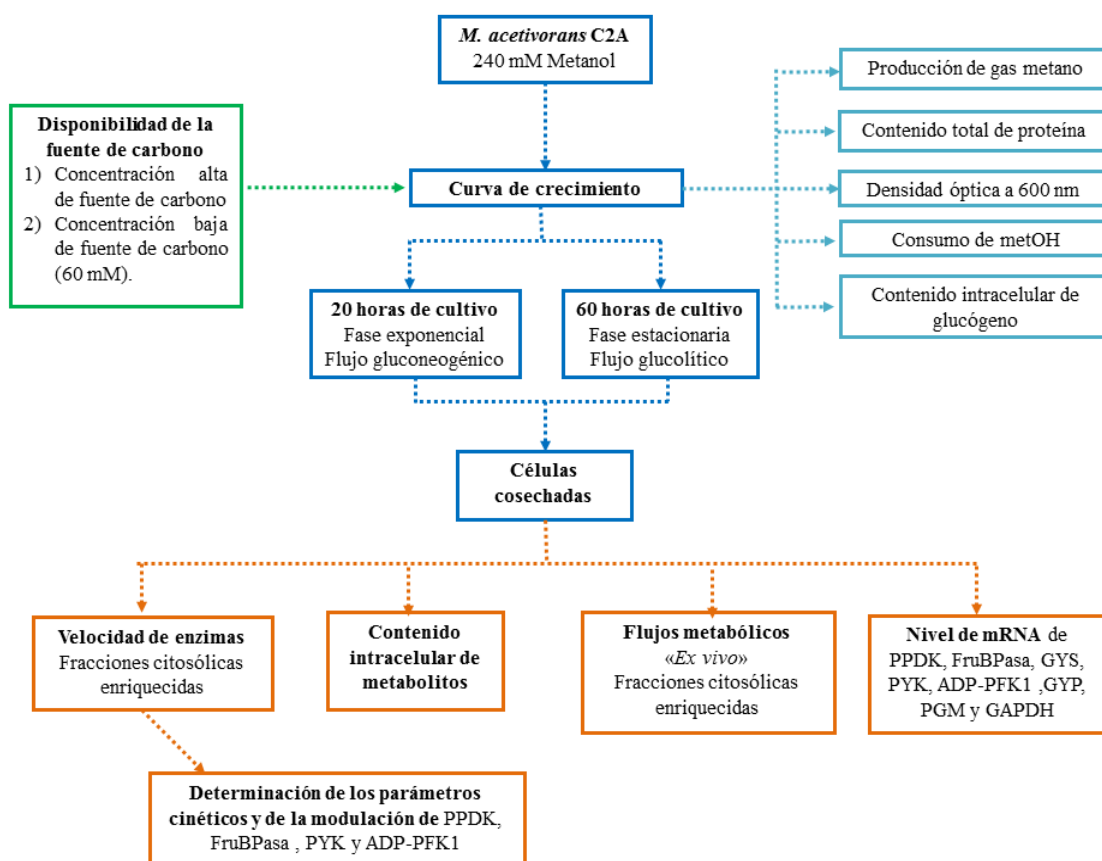


Figura 4: Estrategia experimental general del proyecto.

La cepa de *Methanosarcina acetivorans* C2A utilizada para la realización de este proyecto fue donada por el Profesor James G. Ferry de la Universidad Estatal de Pensilvania, Estados Unidos. Este microorganismo metanogénico fue cultivado en condiciones anaeróbicas en un medio HS (*high salt*) que asemeja la composición del agua de mar (400 mM NaCl) y utilizando 240 mM de metanol como fuente de carbono. El

crecimiento celular fue determinado monitoreando la producción de gas metano, el contenido total de proteína y la absorbancia a 600 nm. Además, se determinó el consumo de la fuente de carbono externa y el contenido intracelular de glucógeno (en un inicio como un parámetro de la medición del flujo gluconeogénico), lo que permitió identificar las fases de su síntesis y su degradación. La fase exponencial de crecimiento se identificó en las primeras 20 horas de cultivo y la fase estacionaria posterior a las 48 horas. Para la caracterización bioquímica se utilizaron las células cultivadas durante 20 ó 60 horas. En fracciones citosólicas enriquecidas se determinó la actividad de cada una de las enzimas involucradas en las vías gluconeogénica/glicolítica y en el metabolismo del glucógeno, en condiciones de velocidad inicial para conocer la cantidad de enzima activa. Asimismo, se determinó el flujo parcial “*ex vivo*” de gluconeogénesis y glucólisis en fracciones citosólicas enriquecidas y la concentración intracelular de los metabolitos involucrados en estas vías metabólicas. Posteriormente, se hizo un análisis a nivel metabólico (moduladores de la actividad enzimática) y transcripcional (nivel de RNA mensajero) de las proteínas que mostraron un cambio en su velocidad inicial en fracciones citosólicas enriquecidas de células de 20 horas (gluconeogénesis: piruvato fosfato dicinasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa y glucógeno sintasa) y 60 horas de cultivo (glucólisis: piruvato cinasa, fosfofructocinasa 1 dependiente de ADP y glucógeno fosforilasa).

Por otro lado, con la finalidad de saber si el estado nutricional de las células modula a las vías metabólicas, se utilizaron los siguientes protocolos experimentales:

- 1.- Concentración mayor de la fuente de carbono. Las células fueron cultivadas en 240 mM de metanol y después de 20 horas de cultivo se les adicionó más fuente de carbono (240 mM metanol) con la finalidad de prolongar la fase exponencial de crecimiento. Las células fueron cosechadas después de 40 horas de cultivo y se determinó la actividad de fructosa

1,6-bisfosfatasa, fosfofructocinasa 1 dependiente de ADP y piruvato cinasa, y los flujos metabólicos.

2.- Concentración menor de la fuente de carbono: Las células fueron cultivadas en 60 mM de metanol y se determinó la curva de crecimiento, el consumo de la fuente de carbono, los flujos metabólicos y la actividad de fructosa 1,6-bisfosfatasa, fosfofructocinasa 1 dependiente de ADP y piruvato cinasa.

1.6. RESULTADOS

1.6.1. Datos y artículo publicado

Artículo de investigación: The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes.

Santiago-Martínez M.G., Encalada R., Lira-Silva E., Pineda E., Gallardo-Pérez J.C., Reyes-García M.A., Saavedra E., Moreno-Sánchez R., Marín-Hernández A., Jasso-Chávez R.(2016).The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes. *FEBS Journal*. 283(10), 1979-1999. doi: 10.1111/febs.13717.

En este artículo se realizó la caracterización de la estructura y la regulación de las vías de la gluconeogénesis/glucólisis y del metabolismo del glucógeno en la arquea marina *Methanosarcinaacetivorans*. Se determinó la actividad de cada una de las enzimas y la concentración de los metabolitos involucrados en estas vías metabólicas, así como los flujos metabólicos. Además, se hizo un análisis a nivel metabólico y transcripcional de las proteínas que mostraron un cambio en su actividad en células de 20 horas

(gluconeogénesis) y 60 horas de cultivo (glucólisis). Los resultados mostraron que *M. acetivorans* es capaz de sintetizar glucógeno y que éste puede ser degradado a través de una vía glucolítica, la cual no había sido descrita completamente en metanogénicos. Además, los datos sugirieron que el estado nutricional de la célula regula a nivel transcripcional (cambios en el nivel de transcrito para los genes que codifican para la glucógeno sintasa, glucógeno fosforilasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa, piruvato fosfato dicinasa y piruvato cinasa) y a nivel metabólico (modulación de la velocidad de la glucógeno fosforilasa, hexosa fosfato isomerasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa, fosfofructocinasa 1 dependiente de ADP y piruvato cinasa), a los flujos glucolítico/gluconeogénico y el metabolismo del glucógeno.

The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes

Michel Geovanni Santiago-Martínez, Rusely Encalada, Elizabeth Lira-Silva, Erika Pineda, Juan Carlos Gallardo-Pérez, Marco Antonio Reyes-García, Emma Saavedra, Rafael Moreno-Sánchez, Alvaro Marín-Hernández and Ricardo Jasso-Chávez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México DF, México

Keywords

carbohydrate metabolism; metabolic regulation; methanogenesis; transcriptional regulation

Correspondence

A. Marín-Hernández or R. Jasso-Chávez,
Departamento de Bioquímica, Instituto
Nacional de Cardiología, Juan Badiano #1,
Sección XVI, Tlalpan, México DF 14080,
Mexico
Tel: +52 55 5573 2911
Fax: +52 55 5573 0994
E-mails: marinhernandez@yahoo.com.mx;
rjassocho@gmail.com

(Received 1 November 2015, revised 10
March 2016, accepted 17 March 2016)

doi:10.1111/febs.13717

Gluconeogenesis is an essential pathway in methanogens because they are unable to use exogenous hexoses as carbon source for cell growth. With the aim of understanding the regulatory mechanisms of central carbon metabolism in *Methanosarcina acetivorans*, the present study investigated gene expression, the activities and metabolic regulation of key enzymes, metabolite contents and fluxes of gluconeogenesis, as well as glycolysis and glycogen synthesis/degradation pathways. Cells were grown with methanol as a carbon source. Key enzymes were kinetically characterized at physiological pH/temperature. Active consumption of methanol during exponential cell growth correlated with significant methanogenesis, gluconeogenic flux and steady glycogen synthesis. After methanol exhaustion, cells reached the stationary growth phase, which correlated with the rise in glycogen consumption and glycolytic flux, decreased methanogenesis, negligible acetate production and an absence of gluconeogenesis. Elevated activities of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthetase complex and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase suggested the generation of acetyl-CoA and pyruvate for glycogen synthesis. In the early stationary growth phase, the transcript contents and activities of pyruvate phosphate dikinase, fructose 1,6-bisphosphatase and glycogen synthase decreased, whereas those of glycogen phosphorylase, ADP-phosphofructokinase and pyruvate kinase increased. Therefore, glycogen and gluconeogenic metabolites were synthesized when an external carbon source was provided. Once such a carbon source became depleted, glycolysis and methanogenesis fed by glycogen degradation provided the ATP supply. Weak inhibition of key enzymes by metabolites suggested that the pathways evaluated were mainly transcriptionally regulated. Because glycogen metabolism and glycolysis/gluconeogenesis are not present in all methanogens, the overall data suggest that glycogen storage might represent an environmental advantage for methanosarcinales when carbon sources are scarce. Also, the understanding of the central carbohydrate metabolism in methanosarcinales may help to optimize methane production.

Abbreviations

1,3BPG, 1,3-bisphosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; AcK, acetate kinase; ALDO, fructose 1,6-bisphosphate aldolase; CODH/ACS, carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthetase complex; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; *Eh*, recombinant enzyme of *Entamoeba histolytica*; EMP, Embden–Meyerhoff–Parnas; ENO, enolase; Erythro4P, erythrose 4-phosphate; Fru1,6BP, fructose 1,6-bisphosphate; Fru6P, fructose 6-phosphate; FruBPase, fructose 1,6-bisphosphatase; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; G6PDH, glucose 6-phosphate dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPN, nonphosphorylating GAPDH; GAPOR, glyceraldehyde 3-phosphate: ferredoxin oxidoreductase; Glc1P, glucose 1-phosphate; Glc6P, glucose 6-phosphate; GYP, glycogen phosphorylase; GYS, glycogen synthase; HK, hexokinase; HPI, hexose 6-phosphate isomerase; PEP, phosphoenolpyruvate; PEPS, phosphoenolpyruvate synthase; PFK1, phosphofructokinase 1; PFOR, pyruvate: ferredoxin oxidoreductase; PGAM, 3-phosphoglycerate mutase; PGK, 3-phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglucomutase; PPK, pyruvate orthophosphate dikinase; Pta, phosphotransacetylase; PYK, pyruvate kinase; TPI, triosephosphate isomerase; UGPase, UDP-glucose pyrophosphorylase; α GPDH, α -glycerophosphate dehydrogenase.

Introduction

For cell growth supported by carbon sources other than exogenous hexoses, gluconeogenesis becomes an essential pathway for the generation of biosynthetic intermediates and polysaccharide storage. Gluconeogenesis and glycolysis share most of the enzymes because these catalyze reversible reactions under physiological conditions. There are, however, two irreversible glycolytic steps: (a) the phosphorylation of fructose-6P (Fru6P) to fructose 1,6 bisphosphate (Fru1,6BP) catalyzed by ATP-PFK1 and (b) the dephosphorylation of phosphoenolpyruvate (PEP) to form pyruvate and ATP catalyzed by pyruvate kinase (PYK). Hence, gluconeogenesis requires enzymes that catalyze reactions that are able to bypass the thermodynamic constraints of these glycolytic steps. In some microorganisms (amoeba, *Euglena*, bacteria), the first reaction is catalyzed by the ATP-PFK1/fructose 1,6-bisphosphatase (FruBPase) couple or by a reversible PPI-dependent phosphofructokinase 1 (PFK1). In turn, the PYK reverse reaction can be undertaken by the pyruvate carboxylase plus PEP carboxykinase couple [1], or by the reversible PEP synthase (PEPS) or pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) [2,3].

Glycolysis in organisms belonging to the *Archaea* domain is carried out by the Embden–Meyerhoff–Parnas (EMP) or Entner–Doudoroff pathways [3]. The sequenced genomes of methanogens, considered to comprise one of the largest and most diverse groups in the archaea domain (with over 50 species) show genes annotated for enzymes belonging to the EMP pathway [4,5], which are also used for gluconeogenesis [6].

The synthesis of pyruvate and PEP to initiate gluconeogenesis represent key steps in the intermediary metabolism of methanogens. Kenealy and Zeikus [7], in *Methanosarcina barkeri*, and Abbanat and Ferry [8], in *Methanosarcina thermophila*, proposed that the condensation of methyl tetrahydromethanopterin with CO catalyzed by the carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthetase (CODH/ACS complex) is a key step in the synthesis of acetylCoA for further transformation into pyruvate catalyzed by pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFOR). In the acetogenic anaerobe *Moorella thermoacetica*, PFOR catalyzes the pyruvate synthesis from acetylCoA [9], whereas, in a *M. barkeri* mutant cultured with pyruvate as sole carbon source, PFOR was probed to be essential for acetylCoA production [10]. Accordingly, PFOR appears to represent a common step involved in the inter-conversion of pyruvate and acetylCoA in many archaea [3]. Genes encoding PFOR are present in the genomes of the five

taxonomical orders of methanogens sequenced so far (Table 1).

PEPS ($\text{Pyr} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{PEP} + \text{AMP} + \text{Pi}$) is reported to be reversible in *Pyrococcus furiosus*, whereas a glycolytic function for this enzyme has been proposed in *Thermococcus kodakarensis* [3,11]. PPDK ($\text{Pyr} + \text{ATP} + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{PEP} + \text{AMP} + \text{PPi}$) appears to have a preferred catabolic function in *Thermoproteus tenax* [12]. *Methanosarcinales* and few other methanogens have genes encoding both PEPS and PPDK (Table 1), suggesting that these enzymes may catalyze PEP synthesis under physiological conditions [12].

Enzyme activities of the EMP pathway, as well as some others involved in the synthesis/degradation of glycogen, have been described in *M. thermophila* [13], *Methanosaeta* (formerly named *Methanotrix*) [14], *Methanococcus maripaludis* [15] and *Methanococcoides methylutens* [16], as well as in diverse archaea [17]. Despite the ability of some methanogens to accumulate glycogen [15–17], the genes and functional enzymes involved in glycogen synthesis and degradation have not been yet identified in many of them (Table 1).

On the other hand, glycogen levels are involved in the ability of microorganisms to resist different types of stresses, such as nutrient starvation in *Arthrobacter* spp. [18] and low temperature and high osmolarity in antarctic *Penicillium* strains [19]. Moreover, gluconeogenesis and a high glycogen content are required for biofilm synthesis in *Salmonella typhimurium* [20]. Because methanogens can only use simple molecules for growth such as $\text{CO}_2 + \text{H}_2$, methanol, methylamines, formate, CO and acetate, gluconeogenesis becomes an essential pathway not only for providing precursors for the synthesis of macromolecules [21], but also for biofilm synthesis, an important resistance mechanism in *M. acetivorans* against stressors such as Cd^{2+} or O_2 [22,23].

Methanosarcina spp. consume almost 90% of the carbon source for ATP synthesis by the methanogenic pathway and the rest is used for biomass formation; hence, the tight control of the biosynthetic pathways is crucial for efficient carbon assimilation. In this regard, information about the mechanisms controlling the anabolic/catabolic processes in methanogens is scarce. The present study analyzed the central carbon metabolism remodeling (at the level of gene transcription, enzyme activities, pathway fluxes and metabolite contents) performed by *M. acetivorans* when transitioning from a cell proliferative phase, with active exogenous carbon source consumption, to a nonproliferative phase, with an absence of exogenous carbon source. This is the first report for a methanogen where the complete set of enzymes and

Table 1. Annotated genes encoding proteins putatively involved in key steps of the gluconeogenic/glycolytic and glycogen metabolism pathways in methanogens.

Organism	<i>pfor</i>	<i>pps</i>	<i>pyk</i>	<i>ppdk</i>	<i>pfk</i>	<i>fbp</i>	<i>fbp/ald</i>	<i>gyp</i>	<i>gys</i>
<i>Methanocaldococcus</i>	✓	✓	✓	×	✓	×	✓	✓	✓
<i>Methanoterris</i>	✓	✓	×	×	✓	×	✓	α-glucan	Starch
<i>Methanococcus</i>	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	α-glucan	Starch
<i>Methanothermococcus</i>	✓	✓	✓	×	✓	×	✓	α-glucan	Starch
<i>Methanosarcina</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓ Type II	×	✓	✓
<i>Methanococcoides</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	×
<i>Methanohalophilus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓ Type II	×	Debranching	×
<i>Methanohalobium</i>	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	Debranching	×
<i>Methanosalsum</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓ Type II	×	α-glucan	×
<i>Methanobus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓ Type II	×	α-glucan	×
<i>Methanomethylovorans</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓ Type II	×	Debranching	×
<i>Methanosaela</i>	✓	✓	×	×	✓	×	✓	✓	✓
<i>Methanospirillum</i>	✓	✓	✓	✓	✓ (PPI)	✓	×	✓	×
<i>Methanocorpusculum</i>	✓	✓	×	×	×	×	✓	×	×
<i>Methanoculleus</i>	✓	✓	✓	×	✓	×	✓	Debranching	×
<i>Methanoplanus</i>	✓	✓	×	×	×	✓	×	×	×
<i>Methanoregula</i>	✓	✓	×	✓	✓	✓	✓	Starch	×
<i>Methanosphaerula</i>	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	×	×
<i>Methanocella</i>	✓	✓	✓	×	✓ (PPI)	✓	×	Debranching	β-glucan
<i>Methanomassiliococcus</i>	✓	✓	×	×	×	×	✓	×	×
<i>Methanothermobacter</i>	✓	✓	×	×	×	×	✓	×	×
<i>Methanosphaera</i>	✓	✓	×	×	×	✓	✓	×	×
<i>Methanobrevibacter</i>	✓	✓	✓	✓	×	×	✓	×	×
<i>Methanobacterium</i>	✓	✓	×	×	×	×	✓	×	×
<i>Methanothermus</i>	✓	✓	×	×	×	×	✓	×	×
<i>Methanopyrus</i>	✓	✓	×	×	×	Y	✓	×	×
<i>Methanomethylophilus</i>	✓	✓	×	×	×	×	✓	×	×
<i>Methanoplasma</i>	✓	✓	×	×	×	×	✓	×	×
<i>P. furiosus</i>	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	✓	✓

Gene mining was carried out by using the KEGG database. (PPI), PPI dependent-PFK; *fbp/ald* gene annotated for bifunctional FruBPase/aldolase enzyme; where indicated, *gyp* and *gys* are sequences encoding proteins putatively involved in starch and α- or β-glucan synthesis/degradation. For comparison, genes found in the genome from *P. furiosus* are reported. Genes annotated (✓) or absent (×) in the genomes are shown.

metabolites from gluconeogenesis is characterized. Glycogen storage as an energy source for the phosphorylation of glucose for the generation of pyruvate as a substrate for the acetoclastic methanogenic pathway for further ATP synthesis is also described. In addition, the metabolic and transcriptional regulation of these pathways is analyzed and discussed.

M. acetivorans is the archaea with the largest genome sequenced so far and also has ecological and biotechnological relevance for its active methane production. Determination of the regulatory mechanisms of gluconeogenesis/glycolysis and glycogen metabolism may help to explain how methanogens contend against nutritional stress.

Results

Cell growth, methanol consumption and glycogen content

The exponential growth phase of *M. acetivorans* cultured in 240 mM methanol lasted from 5 to 20 h of cultivation. Active cell growth, as determined by methane production and optical density, correlated well with high methanol consumption (Fig. 1A). As judged by iodine staining (which produced a typical brown color), it was determined that the carbohydrate polymer synthesized by *M. acetivorans* was glycogen [24]. A steady increase in glycogen content (Fig. 1B) was observed during the exponential phase from 0 to 12 h with a net flux of 17.3 ± 3 nmol glucose equivalents $(\text{h} \times \text{mg protein})^{-1}$ ($n = 8$); thereafter, this rate slowed down from 12 to 48 h of culture with a net synthesis flux of 6.4 ± 0.5 nmol glucose equivalents $(\text{h} \times \text{mg protein})^{-1}$ ($n = 8$). The glycogen content reached up a maximum of 788 ± 31 nmol glucose equivalents $(\text{culture})^{-1}$ after 50 h of cultivation, which correlated with the complete methanol exhaustion. In turn, 8.2 ± 0.3 mg protein $(\text{culture})^{-1}$ were generated at the 40 h point and remained constant up to 60 h. Thereafter, when the cell cultures reached the stationary phase, glycogen was rapidly consumed at a specific

rate of 16.8 ± 3 nmol glucose equivalents $(\text{h} \times \text{mg protein})^{-1}$ (Fig. 1B).

Ex vivo gluconeogenic and glycolytic rates and in vivo methane production by glycogen degradation

Genes encoding glycogen synthase, glycogen phosphorylase, FruBPase, ADP-PFK1 and PYK are found in the *M. acetivorans* genome (Table 1), suggesting that glycogen may be synthesized and metabolized by the gluconeogenic and glycolytic EMP pathways for generation of anabolic precursors and for ATP and NAD(P)H production, respectively. To assess whether the nutritional status affects the enzyme contents/activities of the central carbohydrate metabolism in *M. acetivorans*, *ex vivo* glycolytic and gluconeogenic fluxes were determined in extracts from cells grown at different times of the growth curve. Because methanogens do not yield lactate as an end-product of glucose catabolism such as in bacteria and mammalian cells, the flux cannot be readily determined in whole cells. Hence, the preference in the direction of pathway fluxes was determined in cytosolic-enriched fractions in the presence of physiological concentrations of the adenine nucleotides (see Materials and methods) by measuring, in separate experiments, the rates of NADH oxidation/NADP⁺ reduction catalyzed by the sets of enzymes within the segments from glucose 6-phosphate (Glc6P) to dihydroxyacetone phosphate (DHAP) for glycolysis, DHAP to Glc6P for gluconeogenesis, and 3-phosphoglycerate (3PG) to pyruvate for the common segment of both pathways.

The gluconeogenic flux rate in extracts of cells harvested at 20 h of culture was 18 ± 2.6 nmol Glc6P_{produced} $(\text{h} \times \text{mg protein})^{-1}$, whereas the glycolytic Glc6P to DHAP flux was undetectable. By marked contrast, at 60 h of culture, the flux rate of the Glc6P to DHAP segment was 15.4 ± 1.4 nmol Glc6P_{consumed} $(\text{h} \times \text{mg protein})^{-1}$, whereas no gluconeogenic flux was detected in these cells. In turn, the flux rate of the 3PG to pyruvate segment did not change when determined after 20 h [15 ± 2.4 nmol Pyr_{produced} $(\text{h} \times \text{mg protein})^{-1}$; $n = 4$] or 60 h of culture [16 ± 0.6 nmol Pyr_{produced} $(\text{h} \times \text{mg protein})^{-1}$; $n = 4$].

To assess whether the pyruvate produced from glycogen degradation could be used for methane and/or acetate production, N₂ gas was flowed into the 50 h old cell culture bottles (when methanol was already exhausted) to remove all methane produced up to that time. Then, methane production was determined from 50 to 96 h of culture. During this time period, 5.5 ± 0.2 μmol glucose equivalents from glycogen

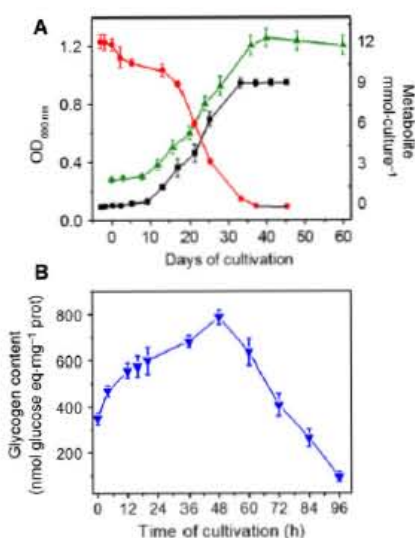


Fig. 1. *Methanosarcina acetivorans* cell growth. (A) Methane production (■) methanol consumption (●) and growth (▲) were determined at the indicated times. Values are the mean \pm SD of eight independent experiments (B) Variations in glycogen content (▼). Values are the mean \pm SD of five independent experiments.

(culture)⁻¹ were consumed, which was indeed accompanied by the production of 11.3 ± 1.5 μmol methane (culture)⁻¹ (mean ± SD; *n* = 4). By contrast, negligible synthesis of acetate from glycogen degradation was determined at this stage (25 ± 4 nmol acetate × culture⁻¹; *n* = 4). These last data suggested that glycogen was mainly metabolized through glycolysis to yield pyruvate, which was further decarboxylated to acetyl-CoA and this in turn was split by the CODH/ACS complex in the acetate pathway into CoA, CO₂ and a methyl group for methane production.

To analyze whether the direction preference of carbon fluxes between 20 and 60 h of culture was a result of changes in the contents of active enzymes, the activities of key enzymes involved in gluconeogenesis and glycogen synthesis [PEPS, PPK, FruBPase and glycogen synthase (GYS)] and in glycogen degradation and glycolysis [glycogen phosphorylase (GYP), ADP-PFK-1 and PYK], as well as the enzymes shared by both pathways, were assessed under near-physiological conditions (37 °C and pH 7). Enzymes involved in the acetylCoA (CODH/ACS complex) and pyruvate synthesis/degradation (PFOR) were also determined.

Enzyme activities of the gluconeogenesis/ glycolysis pathways and intermediate metabolite contents

Because methanol is a one carbon molecule, carboxylation reactions are essential for synthesis of complex molecules. As expected from their abilities to catalyze reversible reactions under physiological conditions, CODH/ACS and PFOR activities determined at 20 and 60 h of cultivation were similar (Table 2), suggesting that pyruvate production by anabolic or catabolic processes (depending on the culture growth phase) is operative in *M. acetivorans*. Furthermore, a significant increase in the intracellular contents of the PFOR-reaction metabolites acetylCoA and pyruvate at 60 h versus 20 h of cultivation was determined (Table 3), suggesting a switch in the reaction to catabolic direction as glycolysis end-products.

As expected from the active glycogen metabolism throughout the exponential and stationary growth phases (Fig. 1), all of the enzyme activities performing gluconeogenic/glycolytic reversible reactions were apparent at both 20 and 60 h of cultivation (Table 2) and similar to those reported for *M. maripaludis* [15]. Most of the enzyme activities remained roughly constant, except for hexose 6-phosphate isomerase (HPI) which increased its activity by the 60 h point and which, in turn, was inhibited by erythrose 4-phosphate (Erythro4P). Remarkably, glyceraldehyde 3-phosphate

Table 2. Activities of enzymes involved in pyruvate production and gluconeogenic/glycolytic pathways.

Enzyme	20 h of growth	60 h of growth
	Specific activity mU × (mg protein) ⁻¹	
HPI	4 ± 0.1	12 ± 2 ^c
ADP-PFK 1	< 0.2	19 ± 2
FBPase	12 ± 1	< 0.2
ALDO	12 ± 3	14 ± 1.5
TPI	1078 ± 76	1086 ± 96
NADP ⁺ -GAPDH	14 ± 3	14 ± 2
PGK	13.5 ± 1	9 ± 0.5 ^c
PGAM	503 ± 61	358 ± 31 ^c
ENO	102 ± 19	112 ± 9
PYK	< 0.2	11 ± 1
PPDK (Pyr synthesis)	25 ± 3	3.3 ± 0.2 ^d
PPDK (PEP synthesis)	268 ± 42	28 ± 5 ^d
PEPS	1.6 ± 0.5	1.2 ± 0.2
PFOR (AcCoA synthesis)	83 ± 26	118 ± 18 ^a
PFOR (Pyr synthesis)	143 ± 13	158 ± 24
CODH/ACS	1332 ± 158	928 ± 190 ^a

Values are the mean ± SD of three or four independent experiments. ^a *P* < 0.05, ^b *P* < 0.025, ^c *P* < 0.005 and ^d *P* < 0.001 versus 20 h (one-population Student's *t*-test for unpaired samples). The PPK, FruBPase, PYK, GAPDH, ALDO, TPI and HPI activities, determined under aerobic conditions, were similar to those determined into the anaerobic chamber (data not shown). The activities of the highly oxygen-sensitive PFOR and CODH/ACS were only determined under anoxic conditions.

dehydrogenase (GAPDH) activity with NADP⁺ (Table 2) was three-fold higher than with NAD⁺. Because NADP⁺ was higher than NAD⁺ (Table 3), it may be expected that GAPDH activity predominantly uses NADP⁺.

According to its sequenced genome and the data described for other archaea [3], in *M. acetivorans*, the synthesis of PEP from pyruvate can be catalyzed by PPK or PEPS. Because PPK activity was 16-fold higher than that of PEPS, and this activity did not change along the cell growth curve (Table 2), PEPS kinetics was not studied further. At the 20 h culture point, PPK activity (determined in both PEP and pyruvate synthesis directions) was higher than at the 60 h point, when it markedly decreased (Table 2). Similarly, FruBPase activity was detected in the 20 h culture cells but not in 60 h cells (Table 2). By contrast, ADP-PFK1 and PYK activities were not detected at 20 h but were present at 60 h of cultivation (Table 2). This enzyme profile correlated with a higher gluconeogenic flux for glycogen synthesis at 20 h of growth and a prevailing glycolytic metabolism at 60 h of culture.

Changes in the active enzyme contents resulted in variation of the intermediate metabolites and the adenine

Table 3. Concentration of intermediate metabolites of the gluconeogenic/glycolytic pathways.

Metabolite	20 h of growth		60 h of growth	
	nmol-mg protein ⁻¹	mM	nmol-mg protein ⁻¹	mM
CoA	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1
AcCoA	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1 ^b	1.3 ± 0.1
Pyruvate	0.3 ± 0.06	0.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1 ^a	3.5 ± 0.2
PEP	0.7 ± 0.1	1 ± 0.1	1.2 ± 0.2 ^d	1.75 ± 0.2
2PG	0.2 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.4 ± 0.07 ^c	0.54 ± 0.1
3PG	0.3 ± 0.1	0.45 ± 0.2	0.2 ± 0.05	0.3 ± 0.08
1,3BPG	0.26 ± 0.06	0.36 ± 0.1	0.15 ± 0.04 ^c	0.2 ± 0.06
G3P	0.3 ± 0.05	0.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1 ^a	2.3 ± 0.1
DHAP	2.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1	1.4 ± 0.1 ^a	2 ± 0.1
Fru1,6BP	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.85 ± 0.2 ^b	2.6 ± 0.2
Fru6P	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.85 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Glc6P	1 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1 ± 0.1	1.6 ± 0.1
Glycogen	590 ± 56		202 ± 42 ^a	
Erythro4P	0.2 ± 0.04	0.3 ± 0.06	0.12 ± 0.03 ^c	0.17 ± 0.04
ATP	3.7 ± 0.15	5.3 ± 0.2	2.5 ± 0.6 ^c	3.5 ± 0.9
ADP	1.5 ± 0.3	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.35	2.7 ± 0.5
AMP	2.4 ± 0.24	3.4 ± 0.3	2.8 ± 0.3	4 ± 0.4
PPi	37 ± 9	52 ± 13	12 ± 2 ^a	18 ± 3
Pi	190 ± 93	272 ± 132	41 ± 13 ^a	59 ± 19
NADP*	0.35 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1
NAD*	< 0.2		< 0.2	

Values are the mean ± SD of three or four independent experiments. ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.025$ and ^d $P < 0.05$ versus 20 h (one-population Student's *t*-test for unpaired samples). Intracellular concentration was calculated assuming an intracellular volume of 0.7 μL of H₂O-mg protein⁻¹ [61,52].

nucleotides pools at the two states of the growth curve (Table 3). At the 60 h point, the contents of pyruvate, PEP, 2PG and glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) increased by 8.3-, 1.7-, 2- and 5.3-fold, respectively, compared to 20 h of growth; the 3PG, 1,3-bisphosphoglycerate (1,3BPG) and DHAP contents remained roughly constant (Table 3). In turn, the change in the contents of Fru1,6BP, Fru6P and Glc6P was marginal (Table 3). AMP and ADP increased by 16% and 26%, respectively and ATP decreased 33% from 20 to 60 h of culture. Pi and PPi also decreased by 76–78% at 60 h versus 20 h of growth (Table 3).

Enzyme activities of glycogen synthesis and glycogenolysis

Both phosphoglucomutase (PGM) and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase), which catalyze reversible reactions for the synthesis and degradation of glycogen, showed similar activities at 20 and 60 h of growth. By contrast, GYS and GYP activities were higher at 20 and 60 h of growth, respectively

Table 4. Enzyme activities of glycogen metabolism.

Enzyme	20 h growth	60 h growth
	Specific activity mU × (mg protein) ⁻¹	
PGM	3.3 ± 0.3	3.8 ± 0.2
UGPase	4.1 ± 0.3	4.7 ± 0.4
GYS	0.62 ± 0.1	0.15 ± 0.04 ^a
GYP + detaching enzyme	0.16 ± 0.05	0.48 ± 0.15 ^b

Values are the mean ± SD of three independent experiments. ^a $P < 0.005$ and ^b $P < 0.05$, versus 20 h (one-population Student's *t*-test for unpaired samples). GYS activity from archaeal organisms was usually determined under aerobic conditions [56].

(Table 4). AMP (1–4 mM) was an essential activator of the GYP activity.

Kinetic analysis

For kinetic studies, all of the activities were determined at near-physiological (pH 7) and cell growth temperature (37 °C). PPDK affinity ($1/K_m$) for pyruvate was 2.5-fold higher than for PEP, whereas its V_{max} (PEP synthesis) was 7.9-fold than V_{max} (pyruvate synthesis) (Table 5). The K_m values for the other substrates/products, ATP, Pi, AMP and PPi (Table 5), and their intracellular contents (Table 3), indicated that they all were saturating for PPDK under physiological conditions.

PYK activity was essentially activated by monovalent cations (Fig. 2A) and the pH optimum was 7; a decreased activity of 30–32% was observed at pH values of 6.8 and 7.2 (data not shown). Kinetics was hyperbolic with both ADP and PEP (Fig. 2B,C), as also indicated by the linear curves in the Hanes plot (Fig. 2, inset). The known PYK effectors 4 mM AMP and 5 and 10 mM alanine slightly activated the enzyme by 20–25%; Fru1,6BP (from 0.5 to 5 mM) and Glc6P (from 0.5 to 2 mM) did not activate PYK (data not shown). Instead, 2.4 mM ATP inhibited the activity by 50% (Table 5).

Regarding the competing activities for the hexose-phosphate pool PFK and FruBPase, the K_m Fru1,6BP = 0.1 mM of the latter and its high physiological concentration (Table 3) suggested that this enzyme may work near saturation within the cell; however, AMP and Pi, which are strong inhibitors of the enzyme (Table 5), could attenuate its activity. On the other hand, PFK1 activity showed dependence on ADP but not on ATP or PPi as phosphoryl donors. Acetyl-P (at 5 mM) was also a substrate for this ADP-PFK1, although the activity was only 33% of that with ADP (data not shown), as reported for other methanogens [17]. The enzyme was essentially activated by

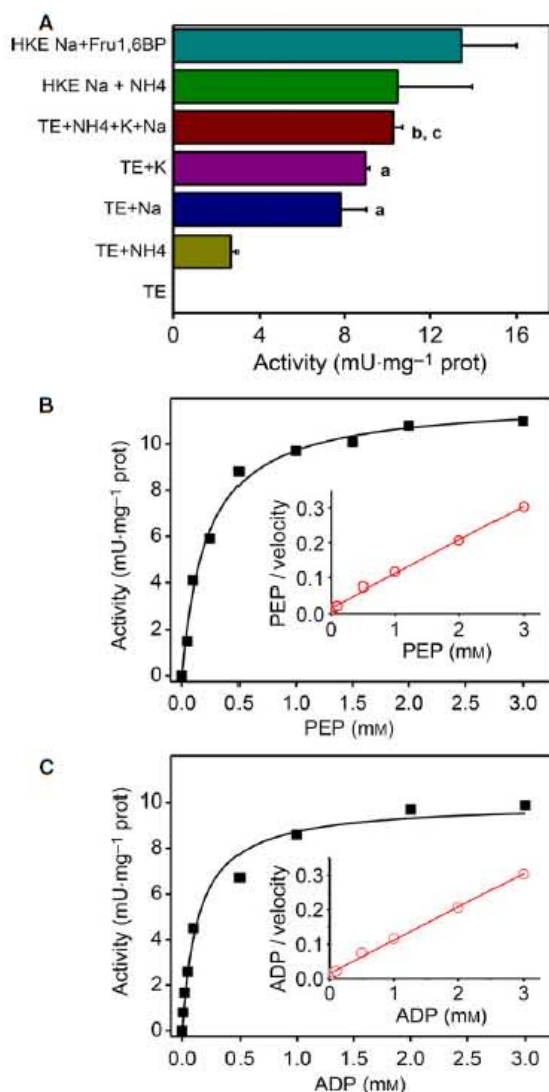


Fig. 2. Modulation of PYK activity in *M. acetivorans*. (A) Activation by monovalent cations (alone or in combination) and Fru1,6BP. Activity was determined in TE: Tris buffer plus EGTA, HKE Na: Hepes buffer plus K⁺, NH₄⁺, Na⁺ and EGTA (see Materials and methods). Values are the mean \pm SD of three independent experiments. ^a $P < 0.001$ versus TE + NH₄⁺, ^b $P < 0.01$ versus TE + Na⁺, ^c $P < 0.025$ versus TE + K⁺ (one-population Student's *t*-test for unpaired samples). The PYK kinetics when varying PEP (B) or ADP (C) was hyperbolic. Assays were all determined at pH 7 and 37 °C with 1.5 mM ADP and varied PEP in (B) and with 3 mM PEP and varied ADP in (C). Insets: Hanes linear replots indicating that the enzyme kinetics is hyperbolic but not cooperative.

120 mM K⁺ + 50 mM Na⁺ > 7 mM NH₄⁺ and such activation was additive. In the presence of these monovalent cations, no significant inhibitory effect by 1 mM

Table 5. Kinetic parameters of key enzymes of the gluconeogenic/glycolytic pathways in *M. acetivorans*.

Enzyme	K_m (mM)	Inhibitor (mM)
FruBPase	Fru1,6BP, 0.11 \pm 0.01	IC ₅₀ AMP = 0.06 \pm 0.01 IC ₅₀ Pi = 62 \pm 6
ADP-PFK-1	Fru6P, 0.13 \pm 0.01 ADP, 0.3 \pm 0.02	IC ₅₀ AMP = 3.6 \pm 1 K_i ATP versus Fru6P = 1.2 \pm 0.1 mixed type, α = 1.2 \pm 0.1 K_i ATP versus ADP = 0.15 mixed type, α = 4.9
PPDK	Pyr, 0.16 \pm 0.02 ATP, 0.11 \pm 0.01 Pi, 0.12 \pm 0.02 PEP, 0.46 \pm 0.1 AMP, 0.13 \pm 0.02 PPI, 0.18 \pm 0.02	Not determined
PYK	PEP, 0.22 \pm 0.01 ADP, 0.13 \pm 0.02	IC ₅₀ ATP = 2.4 \pm 0.1
HPI	Fru6P, 0.1	IC ₅₀ Erythro4P = 0.15 \pm 0.04

Values are the mean \pm SD of three or four independent experiments, except for HPI K_m values ($n = 1$). V_{max} values are shown in Table 2. Fwd, PEP synthesis; Rev, pyruvate synthesis.

citrate (Fig. 3A) or 2 mM Pi (data not shown) on ADP-PFK1 activity was attained. A pH optimal value of 7 was observed, whereas, at pH values of 6.8 and 7.2, a 10% decreased activity was observed (data not shown). The purified ADP-PFK1 activity from *P. furiosus* is partially inhibited by 300 mM NaCl or KCl [25]. Similarly, the ADP-PFK1 activity from *M. acetivorans* was inhibited by 58% with 300 mM KCl or NaCl, in comparison to the activity shown with 120 mM KCl plus 60 mM NaCl. Hence, the ADP-PFK1 kinetic parameters were determined in the presence of 120 mM K⁺ plus 60 mM Na⁺ at pH 7 (for more details, see the Materials and methods). Hyperbolic kinetics when varying Fru6P as substrate was observed even in the presence of ATP and at low [K⁺] or [H⁺] (data not shown). Moreover, ATP behaved as a simple mixed-type inhibitor versus Fru6P (Fig. 3B) and also versus ADP. In turn, 3.6 mM AMP inhibited the activity by 50% (Table 5).

Transcript levels of the enzymes catalyzing irreversible steps

The remarkable changes in the activities of PPDK, PYK, ADP-PFK1, FruBPase, GYS and GYP determined in the two metabolic steady states (Tables 2 and 4), which depended on the nutritional status, could be a result of: (a) transcriptional regulation to modulate enzyme content/activity by protein synthesis and degradation and (b) covalent regulation.

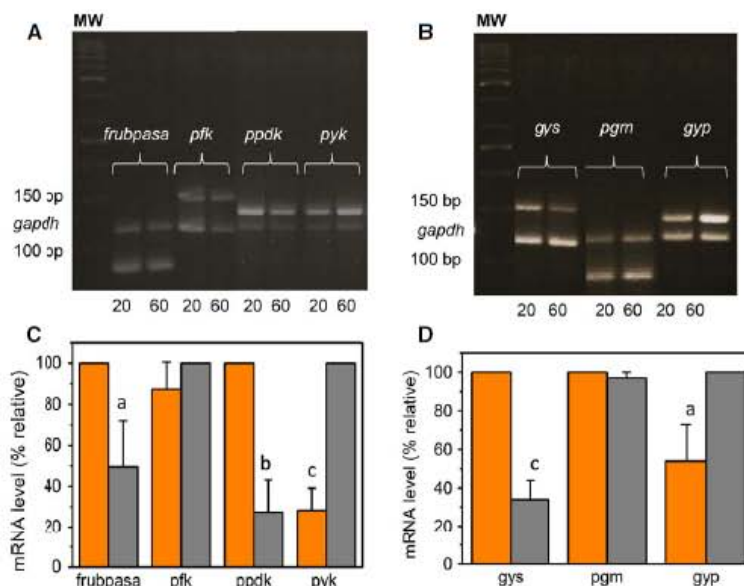


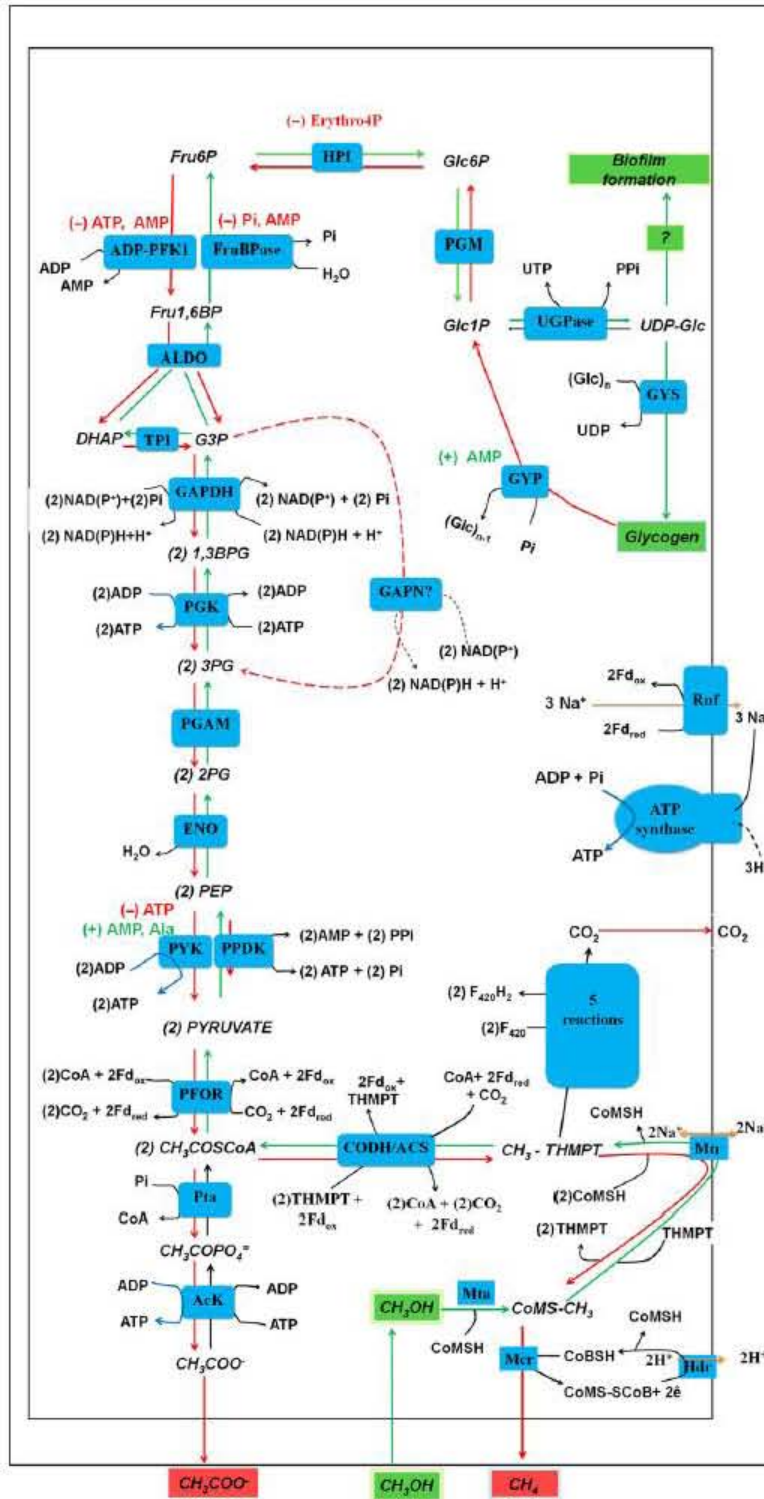
Fig. 4. Transcript levels of ORFs encoding putative gluconeogenic, glycolytic and glycogen metabolism enzymes in *M. acetivorans*. Cells grown on methanol were harvested at 20 h (orange) or 60 h (grey) of culture. mRNA isolation and RT-PCR analysis was carried out by the primer dropping method as indicated in the Materials and methods section and the PCR products were separated by gel electrophoresis. In this strategy, both amplicons were amplified within the same PCR reaction. (A) Transcript contents of gluconeogenic/glycolytic ORFs. (B) Transcript contents of ORFs encoding putative enzymes involved in glycogen metabolism. Densitometric analyses (C, D) were carried out by normalizing the loading signal of the internal control GAPDH. For each pair of conditions, 100% mRNA level is the sample with the highest signal. WM, weight marker; pb, base pairs. Values are the mean \pm SD of three independent experiments. ^a $P < 0.05$ (*frubpase* I, *gyp*), ^b $P < 0.01$ (*ppdk*), ^c $P < 0.005$ (*pyk*, *gys*) versus condition fitted as 100% signal (one-population Student's *t*-test for unpaired samples).

mainly in *Methanococcus jannaschii* and *M. maripaludis* [12], and not in great detail as a result of analyzing only one aspect metabolic regulation, either the transcriptional profile or the enzyme activities or metabolite levels. In the present study, based on our bioinformatic survey of the sequenced genomes of methanogens using the KEGG and NCBI databases, and by determining the enzyme activities and kinetic analysis, as well as the transcript contents and intermediate metabolite levels, the metabolic pathways of the carbohydrate central metabolism were integrally depicted for *M. acetivorans* (Fig. 5). Although the pathway structures are essentially identical to those of other well-characterized organisms, some kinetic peculiarities were found that differed from other archaea.

M. acetivorans is able to synthesize glycogen in higher amounts than *M. thermophila* [13]. Accordingly, the bioinformatic survey yielded sequences coding for enzymes putatively involved in starch and α - or β -glucan synthesis/degradation (Table 1). Moreover, the proposed pathway structures differ somewhat from those reported for *M. thermoautotrophicum* and *M. maripaludis*, in which glycolysis has a bifunctional

ADP-glucokinase/PFK, archaeal-type class I FruBPase, glyceraldehyde 3-phosphate: ferredoxin oxidoreductase (GAPOR) and PYK, whereas gluconeogenesis has PEPS and bifunctional FruBPase/aldolase [12,15,26].

According to genomic and biochemical data, archaeal gluconeogenesis may contain either a bifunctional FruBPase/fructose 1,6-bisphosphate aldolase (ALDO), which should lead to relatively low/negligible Fru1,6BP levels as a result of its channeling between the two enzyme domains [12,27,28], or two enzymes encoded by different genes, which should lead to the formation of detectable Fru1,6BP levels [16,27,28]. The absence of the bifunctional FruBPase/ALDO gene in methanogens has been reported previously [29]. The data obtained in the present study showed significant ALDO activity accompanied by no FruBPase activity during the glycolytic growth phase and the presence of significant Fru1,6BP levels in *M. acetivorans* (Tables 2 and 3), indicating activities of two separate entities. *M. thermoautotrophicum* ALDO and FruBPase activities are oxygen-sensitive [30], whereas the respective *M. acetivorans* enzymes were stable to air. On the other hand, two genes encoding NAD(P)⁺-GAPDH (MA1018 and MA3345) and two genes



encoding 3-phosphoglycerate kinase (PGK) (MA2669 and MA3592) have been annotated in *M. acetivorans* (Table 6). Each pair of genes showed high identity (GAPDH genes > 40%; PGK genes > 50%). MA1018 used as loading control gene (Fig. 4) showed similar transcript levels during both the gluconeogenic and glycolytic phases. However, MA3345 expression was not examined, and so transcriptional regulation of the other putative NAD(P)-GAPDH cannot be ruled out. The cofactor specificities remain to be determined using the recombinant enzymes encoding these ORFs. Despite these inconveniences, the negligible levels of NAD⁺ determined suggested that GAPDH activity preferentially uses NADP(H) independent of whether the cells have a predominant gluconeogenic or glycolytic metabolism. Percentages of identity and similarity (at the level of amino acid sequence) of the genes encoding the enzymes investigated in the present study in comparison with those from bacteria (*Escherichia coli*) and other archaea (*Pyrococcus* spp.) are shown in Table 7. The higher identity was found between *M. acetivorans* and *Pyrococcus*, indicating more divergence between the methanogen and eubacteria.

Reversibility of CODH/ACS, PFOR and PPK reactions

Similar CODH/ACS activities were determined at both 20 and 60 h of culture, suggesting an essential and constitutive role of this enzyme for anabolic and catabolic reactions (Fig. 5). The acetylCoA synthesis from CO and methyl-THMPT is thermodynamically favored under standard and physiological conditions

($\Delta G' \approx -4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the complete reaction) [31]. For the reversible reaction, some factors that would favor acetylCoA cleavage are the continuous removal of the methyl group from CH₃-THMPT and regeneration of THMPT, driven by Mtr (THMPT *S*-methyltransferase) [31], as well as the removal of CO₂ by carbonic anhydrase. However, the ferredoxin redox state may represent the main factor driven the CODH/ACS reverse reaction.

Genes encoding PFOR are present in the genomes of all orders of methanogens (Table 1), suggesting an essential role for this enzyme in their central carbon metabolism. Using EQUILIBRATOR [32], which calculates Gibbs energies of biochemical compounds and reactions under different conditions (pH 7 and 0.1 M ionic strength), it was determined that, at physiological concentrations of pyruvate, CoA and acetylCoA, the reversibility of the PFOR reaction strongly depends on the CO₂ concentration and the Fd_{red}/Fd_{ox} ratio, indicating that the redox balance is involved in the reaction directionality. With 0.1 mM Fd_{red}, 0.01 mM Fd_{ox} and 14.8 mM CO₂, a $\Delta G'$ of +0.8 kJ·mol⁻¹ was determined. With a HCO₃⁻ concentration of 62 mM in the culture medium and a [HCO₃⁻]/[CO₂] ratio of 4.177 mM at pH 7.0, as estimated by using the Bicarbonator segment of EQUILIBRATOR, the CO₂ concentration of 14.8 mM was determined. By contrast, for the acetylCoA synthesis from pyruvate, with 0.01 mM Fd_{red}, 0.1 mM Fd_{ox} and 10 mM CO₂, a $\Delta G'$ of -26.1 kJ·mol⁻¹ was determined. Indeed, simulations using EQUILIBRATOR showed that, when the Fd_{red}/Fd_{ox} ratio was assumed to be ≥ 1 (0.1 mM Fd_{red} and 0.01 mM Fd_{ox}), the reducing conditions favored the gluconeogenic direction. By contrast, with Fd_{red} = Fd_{ox} (assuming 0.055 mM Fd_{red} and Fd_{ox})

Fig. 5. Proposed carbohydrate central metabolism in *M. acetivorans*. Anabolic (green arrows) and catabolic (red arrows) reactions are indicated. Double boxes indicate the intermembrane space. The enzyme activators (+) and inhibitors (-) determined in the present study are indicated. For methanogenesis from methanol, Mta and Mcr enzymes are involved. In parallel, a methanol fraction is oxidized to CO₂ to provide reducing equivalents as F₄₂₀H₂ in a reaction catalyzed by Mtr (with the consumption of the Na⁺ gradient) to produce methyl-THMPT which, in turn, feeds five more enzymatic reactions to produce CO₂: (a) F₄₂₀-dependent N⁵,N¹⁰-methylene-tetrahydromethanopterin reductase; (b) methylene tetra hydro-methanopterin dehydrogenase; (c) methenyl-tetrahydromethanopterin cyclohydrolase; (d) formyl-methanofuran-tetrahydromethanopterin *N*-formyl transferase; and (e) formyl-methanofuran dehydrogenase. The first anabolic step is catalyzed by the CODH/ACS complex, which is reversible under physiological conditions [55]. Pyruvate synthesis from acetylCoA and CO₂ is catalyzed by PFOR in a favorable thermodynamic reaction. The synthesis of PEP is mainly catalyzed by PPK whereas, in the glycolytic direction, PYK catalyzes the reverse reaction (pyruvate synthesis), with minor contributions by PPK and PEPS. The presence of the MA2860 gene in *M. acetivorans*, encoding for a NAD⁺-aldehyde dehydrogenase with putative GAPN activity and replacing the NADP⁺-GAPDH and PGK reactions as in hyperthermophilic archaea, would modify the glycolytic net ATP yield from glycogen degradation (dashed red line; see also Eqn 3). Once glycogen degradation is activated, most of the carbon flux is driven by glycolysis up to pyruvate, which is decarboxylated by PFOR and the resulting acetyl-CoA converted to methane by the acetoclastic pathway. Black arrows indicate reactions that were not evaluated in the present study. Blue arrows show ATP-producing reactions. Hdr, heterodisulfide reductase; DE, methyl-CoMSH reductase; Mtr, tetrahydro-methanopterin *S*-methyltransferase; Mta, methanol: coenzyme M methyltransferase; Rnf, *Rhodobacter* nitrogen fixation complex, catalyzes reactions involved in energy conservation (Na⁺ or H⁺ pumping, which are further used to drive ATP synthesis throughout the ATP synthase).

Table 6. Enzyme isoforms of the reversible enzymes in the gluconeogenic/glycolytic pathway in methanosarcinales.

Organism	<i>ald</i>	<i>tpi</i>	<i>gap</i>	<i>pgk</i>	<i>pgm</i>	<i>eno</i>
<i>Methano-caldococcus</i>	✓	✓	NAD(P) Fd	✓	✓	✓
<i>Methanotorris</i>	✓	✓	NAD(P) Fd	✓	✓	✓
<i>Methanococcus</i>	✓	✓	NAD(P) Fd	✓	✓	✓
<i>Methano-thermococcus</i>	✓	✓	NAD(P) Fd	✓	✓	✓
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	MA0439 MA2666 MA3889 MA4591	MA4607	MA1018 MA3345 NAD(P)	MA2669 MA3592	MA0132 MA2400 MA2671 MA3008 MA4007	MA1672
<i>M. barkeri</i>	A0176 A0753 A0920 A2224	A0934	A2189 A3564 NAD(P)	A1808 A3563	A0860 A1223 A2222 A2961 A3283	A2850
<i>M. mazei</i>	MM1271 MM1627	MM1278	MM2782 NAD(P)	MM0485	MM0904 MM1418 MM2779 MM2993	MM2836
<i>Methano-coccoides</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-halophilus</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-halobium</i>	✓	✓	NAD(P) Fd	✓	✓	✓
<i>Methanosalsum</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methanobolus</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-methylivorans</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methanosaeta</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-spirillum</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-corporisculum</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methanoculleus</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methanoplanus</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methanoregula</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-sphaerula</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methanocella</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-massiliococcus</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-thermobacter</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-sphaera</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-brevibacter</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-bacterium</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-thermus</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methanopyrus</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>Methano-methylophilus</i>	✓	✓	NAD(P)	✓	✓	✓
<i>P. furiosus</i>	✓	✓	NAD(P) Fd	✓	✓	✓

Gene mining was carried out in the the KEGG database. For methanosarcinales annotated genes coding for isoforms are shown. Genomes showing both NAD(P)⁺ and GAPOR are from methanogens living under extreme conditions of temperature or salinity.

and 10 mM CO₂), the less reducing conditions favored the glycolytic reaction. How the Fd_{red}/Fd_{ox} ratio and the general redox state are maintained throughout the different cell growth phases remains to be determined; however, it is possible that the ABC-type soluble

heterodisulfide reductase plays an important role in maintaining the Fd_{red}/Fd_{ox} balance by using the F₄₂₀H₂ pool [33].

In C4 plants, protists, bacteria and archaea, PPKK catalyzes a physiologically reversible reaction [34] in

Table 7. Percentages of identity and similarity of the amino acid sequences of *M. acetivorans* gluconeogenic/glycolytic enzymes.

Enzyme <i>M. acetivorans</i>	<i>E. coli</i>		<i>P. furiosus</i>	
	Percentage identity	<i>E</i> -value	Percentage identity	<i>E</i> -value
PFOR α subunit (MA0032)	No gene found		49	2×10^{-114}
PPDK (MA0608)	No gene found		No gene found	
HPI (MA0821)	No significant similarity found		28	2×10^{-9}
FruBPase (MA1152) (Type I)	No significant similarity found		27	8×10^{-5}
Enolase (MA1672)	51	3×10^{-131}	96	0
Glycogen phosphorylase (MA1874)	24 ^a	2×10^{-17}	40 ^b	1×10^{-133}
PGM (MA2665)	28	2×10^{-50}	48	2×10^{-140}
Aldolase (MA2666)	25	2×10^{-18}	30	4×10^{-20}
P-glycerate kinase (MA2669)	32	4×10^{-54}	40	4×10^{-102}
P-glycerate mutase (MA2671)	54	0	No significant similarity found	
FruBPase (MA3344) ^c	No gene found		36	1×10^{-41}
GAPDH (MA3345)	24	1×10^{-7}	54 (NADP)	9×10^{-125}
ADP-PFK1 (MA3563)	No ADP-PFK1 present		31	4×10^{-54}
Glycogen synthase (MA3679)	No significant similarity found		No significant similarity found	
PYK (MA3890)	41	8×10^{-114}	48	4×10^{-160}
TP1 (MA4607)	26	2×10^{-12}	57	3×10^{-94}
UGPase(MA4459)	40	4×10^{-71}	56	1×10^{-116}

The data shown were obtained from the KEGG database and represent the highest percentages when comparing bacteria (*E. coli*) and archaeal (*Pyrococcus* spp.). ^a Glycogen/starch/ α -glucan phosphorylase. ^b α -glucan phosphorylase. ^c Inositol-1 monophosphatase/fructose-1,6-bisphosphatase; 17% identity between MA1152 and MA3344 was determined. Genes enclosed in green (gene annotated for PEPs: MA2667) and yellow are grouped in a putative operon. *E*-values were obtained from alignments performed with the NCBI/BLAST and coverage was > 54% of the complete sequence.

which the final direction is probably determined by the metabolic fate of PPI and pH.

Kinetics and transcript content of ADP-PFK1, FruBPase, PYK and PPDK

Kinetic parameters (hyperbolic or sigmoidal pattern, K_m , V_{max} , inhibition mechanism, K_i , IC_{50} values) allow the prediction of the performance of a given enzyme into the cell, including how the different metabolites (substrates, products, activators and inhibitors) regulate enzyme activity.

AMP resulted in the strong negative regulation of FruBPase activity (Table 5), leaving a low but significant gluconeogenic flux. This scenario was completely reversed in cells cultured for 60 h. The decreased transcripts and activities of the gluconeogenic enzymes and the increased levels of the glycolytic ones (plus ADP-PFK1) prompted increased glycogen degradation/glycolytic fluxes after carbon source exhaustion.

The ADP-PFK1 transcript level was similar in both 20 and 60 h cells, although the activity was only apparent in cells grown at 60 h. This suggested that, after 20 h of growth, the transcript may be not translated into protein or, if translated, the enzyme was inactive or metabolically inhibited. Attempts to determine the ADP-PFK1 protein content by western

blotting using polyclonal and monoclonal antibodies (anti-human ATP-PFK1) were carried out without success because of their in-specificity. Hence, specific antibodies produced against methanogen enzymes are needed to determine whether their contents undergo changes under different conditions.

HPI activity was three-fold lower in cells grown for 20 h (versus 60 h), which suggested that this enzyme may favor glycolysis (which predominated in 60 h cells) over gluconeogenesis (which prevailed in 20 h cells). In mammalian cells, HPI is potently inhibited by low concentrations (1–5 μ M) of Erythro4P. In *M. acetivorans*, the IC_{50} Erythro4P value for HPI was similar to the intracellular concentration of Erythro4P determined along the growth curve (Tables 3 and 5), indicating that archaeal HPI activity can be physiologically inhibited by this metabolite.

Three enzymes appear to be involved in the crucial PEP/pyruvate inter-conversion in *M. acetivorans*. In the glycolytic direction, PYK of *M. acetivorans* resembles that of *Thermoplasma acidophilum* because the enzyme activity was fully dependent on K^+ and NH_4^+ [35]. Also, PYK from *M. acetivorans* showed positive (AMP and alanine) and negative (ATP) modulators. In turn, PPDK catalytic efficiency values ($V_{max} f/K_m$ PYR and $V_{max} r/K_m$ PEP) obtained for the *M. acetivorans* enzyme were 18-fold higher for the forward

with respect to reverse reaction, indicating that this enzyme is more efficient for the gluconeogenic reaction (see balanced Eqn 2 below). Interestingly, *E. histolytica* PPK, which has mainly a catabolic function, has a higher affinity for PEP [36], whereas the enzyme of *M. acetivorans* has a higher affinity for pyruvate, in agreement with its gluconeogenic function.

Changes in the transcript content of these enzymes correlated well with the kinetic data. In addition, PEPS activity was low and constant throughout the growth curve, as was as its transcript content (data not shown).

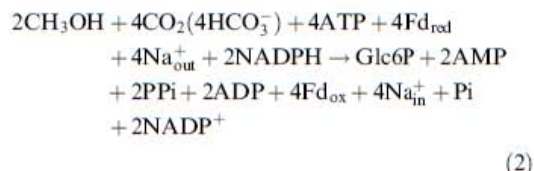
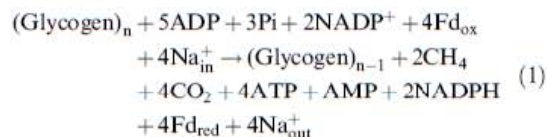
Activities of the enzymes determined in the present study ($V_{\max \text{ app}}$) depend not only on the concentration of such proteins in the cell, but also on the k_{cat} of the reaction, which is inherent, gene-encoded and particular for each enzyme. The relatively high enzyme activities determined in the present study, which were higher than the pathway fluxes, indicate that, for most enzymes and transporters, the full catalytic potential is not displayed and hence these enzymes are 'in excess' and exert no pathway control. By contrast, a few enzymes, usually two or three, have to display almost their full catalytic potential (i.e. they work near substrate saturation) and hence these other enzymes become the rate-controlling steps [37,38].

During the exponential phase of growth (20 h), increased transcript levels of putative ORFs and activities of PPK, FruBPase and GYS and decreased putative ORFs transcripts and activities of GYP and PYK correlated well with higher gluconeogenic/glycogen synthesis fluxes. On the other hand, at 60 h of culture, increased transcript contents and activities of GYP, ADP-PFK1 and PYK were attained together with decreased transcripts and activities of PPK, FruBPase and GYS, correlating with higher glycogen degradation/glycolytic fluxes. Thus, both metabolic (fast, short-term regulation) and transcriptional (slow, long-term regulation) results indicated that ADP-PFK1, FruBPase, PYK and PPK were key steps controlling the gluconeogenic and glycolytic fluxes, whereas GYS and GYP were the main controlling step of the glycogen synthesis and degradation, respectively. Similarly, in the extremophile archaea, *P. furiosus* and *T. kodakarensis*, both metabolic and transcriptional regulation of gluconeogenesis and glycolysis have been proposed when gluconeogenic (pyruvate or peptides) or glycolytic (maltose) substrates are provided as a carbon source [39–43].

Bioenergetics

The balanced equations for *M. acetivorans* glycolysis + methanogenesis from glycogen (Eqn 1) (Fig. 5)

and gluconeogenesis from methanol (Eqn 2) (Fig. 5) would be:



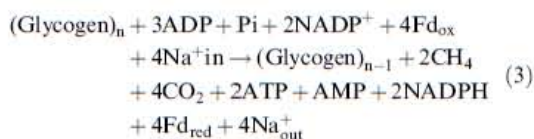
In hyperthermophilic archaea and few other methanogens, including glycogen forming *M. maripaludis*, GAPOR and/or non-phosphorylating GAPDH (GAPN) catalyze the irreversible oxidation of G3P to 3PG bypassing the PGK reaction [12]. Because the PGK and NADP^+ (phosphorylating) GAPDH gene transcripts decreased under glycolytic conditions, it was proposed that PGK and NADP^+ -GAPDH are exclusively anabolic and only catalyze their gluconeogenic reactions [12,41].

However, NADP^+ -GAPDH and PGK activities in *M. acetivorans* (Table 2) were found to be similar at both 20 h (gluconeogenic and exponential growth phase) and 60 h (glycolytic and stationary growth phase) of culture, suggesting their involvement in both pathway fluxes. Because the GAPDH reaction does not have tight thermodynamic constraints for directionality ($\Delta G^{\circ} = +1.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) with either NAD^+ or NADP^+ as coenzyme, the enzyme may catalyze both their glycolytic and gluconeogenic reactions under physiological conditions. Therefore, in contrast to other glycogen degrading methanogens, it is proposed that, in *M. acetivorans*, the PGK/ NADP^+ -GAPDH reactions are used for glycolysis and gluconeogenesis as a result of the apparent absence of GAPOR gene and GAPN activity.

From external glucose, thermophilic archaeal glycolysis can only produce 2 ATP per glucose consumed (from 2 PEP to 2 Pyr by PPS, PPK or PYK) because of the replacement of the GAPDH/PGK reactions by GAPOR or GAPN activities. Because 2 ATP or high-energy bonds are consumed per glucose in the pathway initial reactions (phosphorylations of glucose and Fru6P by hexokinase (HK) and ADP-PFK1, respectively), a net ATP gain of zero is attained in these microorganisms [12]. In some glycogen-degrading methanogens living under extreme conditions of temperature or salinity, which do not take up external glucose, 1 ATP or

high-energy bond can be gained by glycolysis with GAPOR/GAPN because glucose 1-phosphate (Glc1P)/Glc6P is generated from glycogen and Pi (see balanced Eqn 3 below). Because the reconversion of AMP to ADP requires one high-energy bond, the net ATP or high-energy bond gain for glycolysis with GAPOR/GAPN would be one.

Although phylogenetic analyses carried out using KEGG database showed that *M. acetivorans* has no gene for GAPN as reported previously [44], a BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) made with the GAPN gene from *T. kodakarensis* and the genomes from the *Methanosarcina* sp. group (*Methanosarcina*, taxid:2207) resulted in the alignment with a NAD⁺-aldehyde dehydrogenase from *M. acetivorans* (gene MA2860, 32% identity and an *E*-value of 5×10^{-68}). However, no GAPN activity was detected in *M. acetivorans* in cultures of 20 and 60 h in presence of 2 mM NAD⁺ or NADP⁺ and 5 mM G3P (data not shown). If the product of gene MA2860 were present and functional during glycogen degradation (60 h) under experimental conditions other than those assayed in the present study, then a fraction of the intracellular G3P might be oxidized to 3PG with no net synthesis of ATP (Fig. 5). Hence, the balanced equation for *M. acetivorans* glycolysis + methanogenesis from glycogen equation when a putative GAPN is involved would be:



Because glycolysis in *M. acetivorans* is fed by glycogen degradation, the pathway starts from Glc6P (or Glc1P) using one high-energy bond (as ADP) by the ADP-PFK1 reaction, producing an extra 2 ATP by the catabolic NADP⁺-GAPDH/PGK reactions and 2 ATP plus 2 pyruvate by the PYK reaction (Eqn 1) (Fig. 5). Therefore, a net production of 3 ATP (three energy-rich bonds) per Glc6P consumed would be obtained because the ADP molecule consumed in the ADP-PFK1 reaction can be restored from AMP by the adenylate kinase reaction in which 1 ATP molecule is used: $\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{ADP}$ (see balanced Eqn 1 above).

Because 5.7 μmol glucose equivalents of glycogen/culture were consumed from 48 to 96 h of growth (Fig. 1), 17.1 μmol ATP and 11.4 μmol pyruvate would be theoretically yielded. Hence, PFOR should produce 11.4 μmol acetylCoA plus 22.8 μmol Fd_{red}, which in turn may be used by the acetilastic pathway

to stoichiometrically produce ATP and methane. Indeed, we determined that 11 ± 1.5 μmol methane from 48 to 96 h culture were produced (versus 9 μmol methane produced from 0 to 48 h), indicating that pyruvate underwent one decarboxylation and acetyl-CoA was decomposed to produce CO₂ and methyl-THMP by the acetilastic pathway (Fig. 5), as reported for *M. thermophila* [13].

In *M. acetivorans*, Rnf complex pumps out 3 Na⁺ per 2 Fd_{red} [45]. Each decarboxylation reaction (PFOR and CODH/ACS) produces 22.8 μmol Fd_{red} (i.e. 45.6 μmol total Fd_{red}) from the 11.4 μmol pyruvate produced. For each 2 Fd_{red} re-oxidized through the Rnf complex, 2 H⁺ are translocated through the plasma membrane by the membrane-bound heterodisulfide reductase enzyme (Hdr DE) (Fig. 5). In turn, for each methyl group transferred from methyl-THMP to CoMSH by the methyl transferase (Mtr), 2 Na⁺ are also translocated [45]. In summary, the redox reactions from pyruvate to methane would theoretically translocate up to 114 μmol Na⁺/H⁺ (by the Rnf complex *plus* Hdr) and 22.8 μmol Na⁺ (by Mtr). The A₁A₀ ATP synthase needs 3 or 4 translocated ions (H⁺ or Na⁺) to synthesize 1 ATP molecule. Assuming that all Fd_{red} generated by glycogen-derived pyruvate oxidation is re-oxidized by the Rnf complex, the total ATP generated by methanogenesis would be 34–45 μmol per culture (8 mg total protein). On the other hand, acetate production from 48 to 96 h culture was 0.024 μmol acetate \times (culture)⁻¹ yielding 0.024 μmol ATP synthesized by acetate kinase (AcK), an ATP amount far lower (0.04%) than that produced by glycolysis (33.3%) and methanogenesis (66%) (Fig. 5). This negligible role of phosphotransacetylase (Pta) and AcK on ATP production is in agreement with a reconstructed genome-scale metabolic model for *M. acetivorans* [46].

In conclusion, the synthesis and degradation of glycogen and the gluconeogenic/glycolytic pathway are transcriptionally (predominantly) and metabolically (weakly) regulated by the nutritional status in *M. acetivorans*. Methanogens as members of the anaerobic microbial consortia compete for the limited nutrients available [47]. Therefore, the capacity to accumulate glycogen as an energy store might represent an environmental advantage for methanosarcinales during periods of food shortage. On the other hand, methanogenesis is an economically important process and *Methanosarcina* species are the most metabolically versatile methanogens. An understanding of the central metabolism in methanosarcinales may help to optimize and increase methane production.

Experimental procedures

Chemicals

Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), HPI, ALDO, GAPDH, α -glycerophosphate dehydrogenase (α GPDH), α GPDH/triosephosphate isomerase (TPI), PYK, L-LDH, Glc6P, Fru6P and PEP were purchased from Roche (Manheim, Germany). Fru1,6BP, DHAP, G3P, 2PG, 3PG, PEP, Pyr, ATP, ADP, AMP, DTT, NADH, NAD⁺, NADP⁺, amyloglucosidase and lyophilized α GPDH, TPI, *S*-acetyl-coenzyme A synthetase from baker's yeast, AcK from *M. thermophila*, deoxyribonuclease I from bovine pancreas (DNase I), AcCoA and CoA were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Hepes was obtained from Research Organics (Cleveland, OH, USA). Absolute methanol was of analytical grade. Recombinant *Entamoeba histolytica* (*Eh*) PGK, 3-phosphoglycerate mutase (PGAM) and enolase (ENO) were obtained as described previously [48].

Growth conditions and harvesting

M. acetivorans C2A was cultured under anoxic conditions in high salt medium [49] supplied with 240 mM methanol as a carbon source. Cultures were started by adding cell inocula (which proceeded from cell cultures grown for 55–60 h; i.e. at the end of the logarithmic growth phase) to fresh medium for further incubation at 37 °C without shaking. Growth was determined by monitoring the changes in methane production and protein content (in 50 mL cultures). For biochemical characterization (pathway fluxes, enzyme activities and metabolite contents), cells were harvested from 250 mL cultures after 20 or 60 h (exponential and stationary phase of growth, respectively) under anaerobic conditions by centrifugation at 3000 *g* for 10 min and the cell bottom was washed once with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl₂ and 1 mM EGTA (TME buffer).

Determination of metabolites

Washed cell suspensions (1–2 mL) were lysed by adding 3% (v/v) ice-cold perchloric acid, strongly vortexed for 2 min and incubated at 4 °C for 10 min. Next, the cell homogenate was centrifuged at 14 462 *g* and 4 °C for 5 min and the resulting supernatant was neutralized by adding KOH/Tris (3 M/0.1 M) and centrifuged again to discard the perchlorate salts. Extracts were kept at 4 °C for their immediate utilization. Intracellular contents of pyruvate, PEP, 2 phosphoglycerate, 3 phosphoglycerate, 1,3-bisphosphoglycerate, G3P, DHAP, Fru1,6BP, Fru6P, glucose6P, Erythro4P, glycogen, NAD⁺, NADP⁺, AMP, ADP and ATP were determined spectrophotometrically by following the reduction/oxidation of NAD(H) or NADP(H) at 340 nm as described previously [50,51]. Acetate, Pi

and PPI were determined as described previously [22]. The acetylCoA content was determined by coupling the reaction with 10 IU *S*-acetyl-coenzyme A synthetase from baker's yeast, 10 IU HK and 10 IU G6PDH in 50 mM Hepes, 1 mM EGTA, pH 7.0, plus 10 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 5 mM AMP, 2 mM PPI and 10 mM glucose. The CoA content was measured by adding 10 IU *S*-acetyl-coenzyme A synthetase, 10 IU *Eh*-PPDK and 10 IU L-LDH in 50 mM Hepes, 1 mM EGTA, pH 7.0, plus 10 mM MgCl₂, 0.25 mM NADH, 5 mM PEP and 10 mM acetate. This reaction was started by adding 5 mM ATP.

For isolation of glycogen, washed cells (3–5 mg of protein) were lysed by adding 10% KOH (v/v), strongly vortexed for 5 min and incubated at 80 °C for 60 min. Next, the cell homogenate was chilled on ice and 0.5% Na₂SO₄ (v/v) plus 1 mL of 100% ethanol were added. The mix was incubated at 4 °C overnight. Thereafter, the mix was centrifuged at 14 462 *g* and 4 °C for 5 min. The pellet was washed with 1 mL of 80% ethanol. The sample was centrifuged at 14 462 *g* and 4 °C for 5 min. The white pellet (glycogen) was re-suspended with 0.5 mL of 0.2 M sodium acetate pH 4.8 plus 5 IU amyloglucosidase. The mix was incubated at 37 °C overnight. The mix was neutralized by adding KOH/Tris (3 M/0.1 M). The glucose equivalents were determined adding 0.02 mL of glycogen hydrolyzed in mix reaction solution containing 50 mM Hepes and 20 mM MgCl₂ at pH 7 and 25 °C and 1 mM NADP⁺, 4 IU HK and 2–4 IU G6PDH. The reaction was started by adding 5 mM ATP and followed spectrophotometrically at 340 nm. The intracellular concentration of K⁺ was determined by digesting 8–10 mg of protein of washed cells (1 mL) with 3 mL of H₂SO₄/HNO₃ at 96 °C for 4 h. The clarified cell digested solution was used for K⁺ determination in an atomic absorption spectrophotometer (Varian, Belrose, NSW, Australia). With this method and assuming an intracellular water volume of 0.7 μ L·mg protein⁻¹ [36,52], 130 ± 10 mM (*n* = 4) of intracellular K⁺ was determined. Hence, this K⁺ concentration was used for the enzyme activity determinations.

Enzyme activities

Washed cell suspensions were centrifuged and the cell bottom was re-suspended in lysis buffer (0.1 M Na-phosphate at pH 8, 1 mM EDTA and few grains of DNase I), stirred strongly for 5 min and incubated on ice for 30 min. Then, the cell homogenate was centrifuged at 14 462 *g* and 4 °C for 10 min. The supernatant (i.e. the cytosolic enriched fraction with yields of 6–8 mg of protein) was kept on ice and used immediately for enzyme activity assays. When PPDK, PEPS and FruBPase activities, as well as the enzymes involved in the synthesis/degradation of glycogen, were determined, Na-phosphate from the lysis buffer was replaced by 0.1 M Tris, pH 8. Enzyme activities were determined at 37 °C by following the NAD(P)⁺ reduction or

NAD(P)H oxidation at 340 nm in a spectrophotometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) by modification of previously described methodologies [36,50,53]. All enzyme activities were determined using saturating concentrations of substrates ($V_{\max \text{ app}}$) in a reaction buffer that contained 50 mM Hepes, 130 mM KCl, 1 mM EGTA and 50 mM NaCl at pH 7 (HKE-Na buffer). PEPS activity in the ATP synthesis direction was determined by coupling the pyruvate production to the oxidation of 0.25 mM NADH by 4 IU L-LDH; the reaction mix also contained 5 mM PEP, 2.5 mM AMP, 10 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100 and 0.5 mg of cytosolic extract. The reaction was started by adding 2 mM Pi and followed spectrophotometrically at 340 nm.

PPDK activity was determined in the PEP synthesis direction by measuring the consumption of pyruvate or Pi in a reaction mix containing 5 mM ATP, 5 mM Pi, 10 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100 and 0.05–0.1 mg of cytosolic extract. The reaction was started by adding 1 mM pyruvate. Aliquots (0.1 mL) were taken at different times and mixed with 1 mL of 50 mM Hepes, pH 8, 10 mM MgCl₂ and 0.5 mM EGTA; the remnant pyruvate was determined with 0.25 mM NADH and an excess of commercial L-LDH (10 IU). For greater accuracy in determining the PPDK activity, remnant Pi in the aliquots was also measured but the reaction was stopped by freezing with liquid nitrogen and adding 4 mL of Cu-acetate, pH 4.0, plus ammonium molybdate; Pi was then determined as reported previously [22]. There was no activity in the absence of Pi. In the ATP synthesis direction, 5 mM PEP, 2.5 mM AMP, 10 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100 and 0.05–0.1 mg of cytosolic extract were used. The reaction was started by adding 5 mM PPI. Pyruvate production was measured using 0.25 mM NADH and 10 IU of commercial L-LDH. PYK: 5 mM MgCl₂, 0.25 mM NADH, 10 IU L-LDH, 2.5 mM PEP, 0.05% (w/v) Triton X-100 and 0.05–0.1 mg of cytosolic extract. The reaction was started by adding 2 mM ADP.

ENO: 5 mM MgCl₂, 0.25 mM NADH, 10 IU PYK-LDH, 1 mM ADP and 0.05–0.1 mg of cytosolic extract. The reaction was started by adding 1 mM 2PG. PGAM: 5 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH, 1 mM ADP, 2.5 IU ENO from *Eh*, 1 IU PYK/LDH and 0.01–0.025 mg of cytosolic extract. The reaction was started by adding 5 mM 3PG. Spurious PGAM contaminating activity from the coupling *Eh*ENO enzyme was determined by setting up a parallel reaction without cytosolic extract and subtracted from that determined for *M. acetivorans* cellular extracts. PGK: 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.25 mM NADH, 1.5–3 IU GAPDH, 1 mM ATP and 0.05–0.1 mg of cytosolic extract. The reaction was started by adding 2 mM 3PG. There was no activity with GTP. GAPDH: 5 mM cysteine-EDTA, 1 mM NAD⁺ or NADP⁺, 10 mM AsO₄ and 0.05–0.1 mg of cytosolic extract. The reaction was started by adding 3 mM G3P. TPI: 2.5 mM EDTA, 0.25 mM NADH, 1.5–3 IU α GPDH and 0.01–0.025 mg of cytosolic extract.

The reaction was started by adding 3 mM G3P. ALDO: 0.25 mM NADH, 1.5–3 IU α GPDH, 5–9 IU TPI and 0.05–0.1 mg of cytosolic extract. The reaction was started by adding 1 mM Fru1,6BP. FruBPase: 5 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 2–4 IU G6PDH, 2–4 HPI, 0.05–0.1 mg of cytosolic extract and starting the reaction with 1 mM Fru1,6BP. ADP-PFK1: 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.25 mM NADH, 1.5–3 IU α GPDH, 5–9 IU TPI, 1 IU aldolase, 1 mM Fru6P and 0.05–0.1 mg of cytosolic extract. The reaction was started by adding 2 mM ADP. There was no activity with ATP or PPI. HPI: 5 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 2–4 IU G6PDH, 0.05–0.1 mg of cytosolic extract and starting the reaction with 2 mM Fru6P.

PGM activity was determined in the direction of glycogen degradation. The reaction mix in 1 mL of HKE-Na buffer was 2 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100, 2–4 IU G6PDH and 0.5–0.8 mg of cytosolic extract. The reduction of 1 mM NADP⁺ was followed at 340 nm and the reaction was started by adding 1 mM Glc1P. UGPase was determined in the Glc1P synthesis direction by following the reduction of 1 mM NADP⁺, 5 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100, 5 mM PPI, 2–4 IU G6PDH, 2–4 IU PGM, 0.5 mg of cytosolic extract and starting the reaction with 5 mM UDP-glucose. GYS was determined with 1 mM glycogen (glucose equivalents) isolated from *M. acetivorans*, 1 mM UDP-glucose, 10 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100 and 0.5 mg of cytosolic extract following the oxidation of 0.25 mM NADH coupled to 5 mM PEP, 4 IU PYK and 4 IU L-LDH. The reaction was started by adding UDP-glucose. GYP plus glycogen debranching activities were determined in 0.9 mL of buffer HKE Na pH 7 plus 20 mM NaH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100 and 0.5 mg of cytosolic extract following the reduction of 1 mM NADP⁺ coupled to 4 IU G6PDH, 4 IU PGM and starting the reaction with 5 mM glycogen (glucose equivalents). 1 mM AMP was completely essential for maximal activation of the enzyme.

CODH/ACS activity was determined under strict anaerobic conditions (inside of an anaerobic chamber) by measuring the CO-dependent reduction of methyl viologen as reported previously [53]. Briefly, HKE-Na buffer plus 5 mM methyl viologen in an anaerobic bottle sealed with a rubber stopper was saturated with CO by bubbling the gas for 45 min (reaction mixture). Thereafter, 1.8 mL of reaction mixture was poured into a glass cuvette sealed with a rubber stopper previously purged with CO. The reaction was started by adding 0.08–0.1 mg of cytosolic extract (using a syringe) and the reduction of methyl viologen was followed at 603 nm. 10 mM sodium cyanide inhibited the reduction of methyl viologen coupled to CO oxidation by $85 \pm 8\%$ as reported previously [8].

PFOR activity was determined under strict anaerobic conditions. In the pyruvate synthesis direction, the activity was determined by measuring the oxidation of 0.25 mM NADH at 340 nm, using 5 mM MgCl₂, 0.1 mM FeSO₄,

4 IU L-LDH, 1 mM thiamine pyrophosphate (TPP), 10 mM ascorbate, 50 mM NaHCO₃, 0.05% Triton X-100 and 0.05–0.1 mg of cytosolic extract. The reaction was started by adding 1 mM acetylCoA. In the acetylCoA synthesis direction, the reaction mix contained HKE-Na buffer, 0.05–0.1 mg of cytosolic extract, 0.05% Triton X-100, 5 mM MgCl₂ and 10 mM pyruvate. The reaction was started by adding 0.5 mM CoA. Then, aliquots (0.1 mL) were taken at different times and mixed with 1 mL 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 8.0, plus 1 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) and the remnant of CoA was measured at 412 nm. The activity in both directions was completely dependent on the presence of 1 mM TPP and 0.1 mM FeSO₄. In the absence of pyruvate, no consumption of CoA was detected.

The reactions were started by adding specific substrates or cytosol-enriched fraction with no significant differences in their initial rates. Control experiments to ensure that the reaction rates were a linear function of both enzyme concentration and time were routinely carried out (data not shown). Specific substrate and the coupling enzymes were not limiting during the period of the assay. No activity was determined in the absence of the specific substrate or coupling enzymes.

When the effects of Na⁺, NH₄⁺ and K⁺ were determined, Hepes was replaced by 0.1 M Tris, pH 7, and ammonium-free coupling enzymes, desalted through Sephadex G25 insulin syringe columns, were used. When enzymes were not desalted, 3.5–7 mM NH₄⁺ was present depending on the number of coupling enzymes in the assay. Monovalent cations were added from stock solutions at the indicated concentrations.

All enzymatic activities are reported as mU mg protein⁻¹ (1 nmol of substrate consumed or product produced per minute). Kinetic parameters V_{max} and K_m values were calculated by nonlinear regression analysis of the experimental points fitted to the Henri-Michaelis-Menten equation using the ORIGIN, version 5.0 software (<http://www.originlab.com>). The rapid equilibrium rate equation for simple mixed-type inhibition was used in ORIGIN, version 5.0, adjusting the experimental points:

$$v = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} * [S]}{K_s \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} * [S]}$$

where v is velocity, V_{max} is maximal velocity, $[I]$ is the variable concentration of inhibitor, α is the alpha value (i.e. the factor that modifies the K_s value when the inhibitor occupies the enzyme), K_i is the dissociation constant of the Enzyme–I complex, $[S]$ is the variable concentration of substrate and K_s is the dissociation constant of the Enzyme–S complex.

Semi-quantitative RT-PCR analysis

The 'primer dropping' method was used in which the loading control and target gene are amplified in the same PCR reaction but with each at their specific number of cycles; this number was independently tuned to ensure that the amplified products were within the linear interval of amplification. Total RNA was extracted by using the Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. After confirming the RNA integrity by gel electrophoresis, 5 µg of RNA was converted into cDNA with the RevertAid First-Strand Synthesis kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and quantified. Changes in transcript levels were determined by semiquantitative reverse-transcriptase PCR [54]. For co-amplification of the target and loading control ORFs/genes (Table S1), it was previously determined that there was an absence of competition for substrates and DNA polymerase (i.e. the same band intensities of the amplified products should be attained in the single or double amplification reactions). The PCR essays (25 µL) contained 1× Taq DNA polymerase buffer (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2 mM MgCl₂, 0.5 mM deoxyribonucleotide phosphates mix (Fermentas), 15 pmol (0.6 µM) each of the forward and reverse primers specific for each gene, PPKK, PYK, PFK-1, FruBPase, GYS, GYP and PEPS, were added; length primers were 20 bp (for sequence, see Table S1); 2.5 µg of cDNA and 1.25 IU Taq DNA polymerase (Fermentas) were used. The PCR protocol was one cycle at 95 °C for 2 min, followed by 25 (PFK1 and GYP) or 28 (GAPDH, PEPS, PPKK, FruBPase, PYK, PGM and GYS) cycles at 95 °C for 0.5 min, 60 °C for 0.5 min and 72 °C for 1.5 min. The PCR product lengths were in the range of 88–149 bp (Table S1). The samples were supplemented with loading buffer and separated by standard DNA electrophoresis in a 4% (w/v) agarose gel. In addition, it was confirmed that only one PCR product was obtained for each set of primers. Densitometric analysis was carried out and normalization was performed using a transcript of MA1018 ORF encoding for a NAD(P)⁺-GAPDH as a loading control for the PCR against the condition that showed highest band intensity as 100%.

Miscellaneous procedures

The *ex vivo* flux of the glycolytic upper segment (from HPI to TPI) was determined in the cell homogenates (2–2.3 mg of protein) incubated in HKE-Na buffer, pH 7, plus the metabolite physiological concentrations determined in the present study (Table 3): 3.5 mM ATP, 2.5 mM ADP, 4 mM AMP, 15 mM MgCl₂ and 5 IU α-glycerophosphate dehydrogenase (Sigma) as coupling enzyme; the reaction was started by adding 5 mM Glc6P and monitoring NADH oxidation. The *ex vivo* flux of the glycolytic lower segment (PGAM to PYK) was determined in the cell homogenates

(2–2.3 mg of protein) incubated in HKE-Na buffer, pH 7, with 3.5 mM ATP, 2.5 mM ADP, 4 mM AMP, 15 mM MgCl₂ and 10 IU L-lactate dehydrogenase (Sigma), starting the reaction by adding 4 mM 3PG and monitoring NADH oxidation [49]. The gluconeogenic *ex vivo* flux was determined in the cell homogenates (2–2.3 mg of protein) incubated in HKE-Na buffer with 5.7 mM ATP and 3.5 AMP, 10 mM MgCl₂, 10 mM Na-arsenate and 2 IU G6PDH (Sigma), starting the reaction by adding 5 mM DHAP and monitoring NADPH production.

For protein determination, the Biuret method was used. Briefly, cell samples were incubated with 10% (w/v) trichloroacetic acid at 4 °C for 2 h and centrifuged at 14 462 g in a bench centrifuge. After pellet resuspension by vortexing, protein was determined as reported previously [22].

Acknowledgements

This research was partially supported by grants Nos. 156969 (RJC), 180322 (AMH), 178638 (ES) and 239930 (RMS) from CONACyT-Mexico and No. PICS08-5 (RMS, RJC) from ICyTDF, Mexico. Support was also provided by CONACyT PhD fellowships to MGSM (280295) and ELS (268871) from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Author contributions

RJC, AMH and RMS planned the experiments. MGSM, RE, ELS, EP, JCGP and MARG performed the experiments. RJC, MGSM, AMH, ES and RMS analyzed the data. RJC, AMH, ES and RMS wrote the paper.

References

- Fukuda W, Fukui T, Atomi H & Imanaka T (2004) First characterization of an archaeal GTP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Bacteriol* **186**, 4620–4627.
- Tjaden B, Plagens A, Dörr C, Siebers B & Hensel R (2006) Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase of *Thermoproteus tenax*: key pieces in the puzzle of archaeal carbohydrate metabolism. *Mol Microbiol* **60**, 287–298.
- Verhees CH, Kengen SW, Tuininga JE, Schut GJ, Adams MW, De Vos WM & Van Der Oost J (2003) The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem J* **375**, 231–246.
- Galagan JE, Nusbaum C, Roy A, Endrizzi MG, Macdonald P, Fitz Hugh W, Calvo S, Engels R, Smirnov S, Atnoor D *et al.* (2002) The genome of *Methanosarcina acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genom Res* **12**, 532–542.
- Sakai S, Takaki Y, Shimamura S, Sekine M, Tajima T, Kosugi H, Ichikawa N, Tasumi E, Hiraki AT, Shimizu A *et al.* (2011) Genome sequence of a mesophilic hydrogenotrophic methanogen *Methanocella paludicola*, the first cultivated representative of the Order Methanocellales. *PLoS One* **6**, e22898.
- Simpson PG & Whitman WB (1993) Anabolic pathways in methanogens. In *Methanogenesis Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics* (Ferry JG, ed.), pp. 445–472. Chapman and Hall, London.
- Kenealy WR & Zeikus JG (1982) One-carbon metabolism in methanogens: evidence for synthesis of a two-carbon cellular intermediate and unification of catabolism and anabolism in *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol* **151**, 932–941.
- Abbanat DR & Ferry JG (1990) Synthesis of acetyl coenzyme A by carbon monoxide dehydrogenase complex from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol* **172**, 7145–7150.
- Furdui C & Ragsdale SW (2000) The role of pyruvate ferredoxin oxidoreductase in pyruvate synthesis during autotrophic growth by the Wood-Ljungdahl pathway. *J Biol Chem* **275**, 28494–28499.
- Bock AK, Kunow J, Glasemacher J & Schönheit P (1996) Catalytic properties, molecular composition and sequence alignments of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* (strain Fusaro). *Eur J Biochem* **237**, 35–44.
- Hutchins AM, Holden JF & Adams MW (2001) Phosphoenolpyruvate synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* **183**, 709–715.
- Bräsen C, Esser D, Rauch B & Siebers B (2014) Carbohydrate metabolism in archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**, 89–175.
- Murray PA & Zinder SH (1987) Polysaccharide reserve material in the acetotrophic methanogen *Methanosarcina thermophila* strain TM-I: accumulation and mobilization. *Arch Microbiol* **147**, 109–116.
- Pellerin P, Gruson B, Prensier G, Albagnac G & Debeire P (1987) Glycogen in *Methanobrevibacter*. *Arch Microbiol* **146**, 377–381.
- Yu JP, Ladapo J & Whitman WB (1994) Pathway of glycogen metabolism in *Methanococcus marisnigellii*. *J Bacteriol* **176**, 325–332.
- Maitra PK, Bhosale SB, Kshirsagar DC, Yeole TY & Shanbhag AN (2001) Metabolite and enzyme profiles of glycogen metabolism in *Methanococcoides methylutens*. *FEMS Microbiol Lett* **198**, 23–29.
- Verhees CH, Tuininga JE, Kengen SW, Stams AJ, van der Oost J & de Vos WM (2001) ADP-Dependent

- phosphofructokinases in mesophilic and thermophilic methanogenic Archaea. *J Bacteriol* **183**, 7145–7153.
- 18 Zevenhuizen LP (1992) Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* **61**, 61–68.
 - 19 Gocheva YG, Krumova ET, Slokoska LS, Miteva JG, Vassilev SV & Angelova MB (2006) Cell response of antarctic and temperate strains of *Penicillium spp* to different growth temperature. *Mycol Res* **110**, 1347–1354.
 - 20 White AP, Weljie AM, Apel D, Zhang P, Shaykhtudinov R, Vogel HJ & Surette MG (2010) A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development. *PLoS One* **5**, e11814.
 - 21 Rohlin L, Leon DR, Kim U, Loo JA, Ogorzalek RR & Gunsalus RP (2012) Identification of the major expressed S-layer and cell surface layer related proteins in the model methanogenic archaea, *Methanosarcina barkeri* Fusaro and *Methanosarcina acetivorans* C2A. *Archaea* **2012**, 873589.
 - 22 Lira-Silva E, Santiago-Martínez MG, García-Contreras R, Zepeda-Rodríguez A, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R & Jasso-Chávez R (2013) Cd²⁺ resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis. *Environ Microbiol Rep* **5**, 799–808.
 - 23 Jasso-Chávez R, Santiago-Martínez MG, Lira-Silva E, Pineda E, Zepeda-Rodríguez A, Belmont-Díaz J, Encalada R, Saavedra E & Moreno-Sánchez R (2015) Air-adapted *Methanosarcina acetivorans* shows high methane production and develops resistance against oxygen stress. *PLoS One* **10**, e0117331.
 - 24 Cahill G, Walsh PK & Donnelly D (2000) Determination of yeast glycogen content by individual cell spectroscopy using image analysis. *Biotechnol Bioeng* **69**, 312–322.
 - 25 Tuininga JE, Verhees CH, van der Oost J, Kengen SW, Stams AJ & de Vos WM (1999) Molecular and biochemical characterization of the ADP-dependent Phosphofructokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* **274**, 21023–21028.
 - 26 Jansen K, Stupperich E & Fuchs G (1982) Carbohydrate synthesis from acetyl CoA in the autotroph *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* **132**, 355–364.
 - 27 Siebers B, Tjaden B, Michalke K, Dörr C, Ahmed H, Zaparty M, Gordon P, Sensen CW, Zibat A, Klenk HP *et al.* (2004) Reconstruction of the central carbohydrate metabolism of *Thermoproteus tenax* by use of genomic and biochemical data. *J Bacteriol* **186**, 2179–2194.
 - 28 Berg IA, Kockelkorn D, Ramos-Vera WH, Say RF, Zarzycki J, Hügler M, Alber BE & Fuchs G (2010) Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat Rev Microbiol* **8**, 447–460.
 - 29 Say RF & Fuchs G (2010) Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme. *Nature* **464**, 1077–1081.
 - 30 Fuchs G, Winter H, Steiner I & Stupperich E (1983) Enzymes of gluconeogenesis in the autotroph *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* **136**, 160–162.
 - 31 Grahame DA (2011) Methods for analysis of acetyl-CoA synthase applications to bacterial and archaeal systems. *Methods Enzymol* **494**, 189–217.
 - 32 Flamholz A, Noor E, Bar-Even A & Milo R (2012) eQuilibrator the biochemical thermodynamics calculator. *Nucleic Acids Res* **40**, 770–775.
 - 33 Benedict MN, Gonnerman MC, Metcalf WW & Price ND (2012) Genome scale metabolic reconstruction and hypothesis testing in the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans* C2A. *J Bacteriol* **194**, 855–865.
 - 34 Chastain CJ, Failing CJ, Manandhar L, Zimmerman MA, Lakner MM & Nguyen THT (2011) Functional evolution of C(4) pyruvate, orthophosphate dikinase. *J Exp Bot* **62**, 3083–3091.
 - 35 Potter S & Fothergill-Gilmore LA (1992) Purification and properties of pyruvate kinase from *Thermoplasma acidophilum*. *FEMS Microbiol Lett* **73**, 235–239.
 - 36 Sowers KR & Gunsalus RP (1995) Halotolerance in *Methanosarcina spp*: role of N^εacetyl-β-Lysine, α-Glutamate, Glycine Betaine, and K⁺ as compatible solutes for osmotic adaptation. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4382–4388.
 - 37 Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S & Olín-Sandoval V (2008) Metabolic control analysis: a tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *J Biomed Biotechnol* **2008**, 597913.
 - 38 Saavedra E, Marín-Hernández A, Encalada R, Olivos A, Mendoza-Hernández G & Moreno-Sánchez R (2007) Kinetic modeling can describe *in vivo* glycolysis in *Entamoeba histolytica*. *FEBS J* **274**, 4922–4940.
 - 39 Schafer T & Schönheit P (1993) Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Embden-Meyerhof pathway. *Arch Microbiol* **159**, 354–363.
 - 40 Mukund S & Adams MWW (1995) Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* **270**, 8389–8392.
 - 41 Schut GJ, Brehm SD, Datta S & Adams MW (2003) Whole-genome DNA microarray analysis of a hyperthermophile and an archaeon: *Pyrococcus furiosus* grown on carbohydrates or peptides. *J Bacteriol* **185**, 3935–3947.

- 42 Imanaka H, Yamatsu A, Fukui T, Atomi H & Imanaka T (2006) Phosphoenolpyruvate synthase plays an essential role for glycolysis in the modified Embden-Meyerhof pathway in *Thermococcus kodakarensis*. *Mol Microbiol* **61**, 898–909.
- 43 Kanai T, Akerboom J, Takedomi S, van de Werken HJ, Blombach F, van der Oost J, Murakami T, Atomi H & Imanaka T (2007) A global transcriptional regulator in *Thermococcus kodakarensis* controls the expression levels of both glycolytic and gluconeogenic enzyme-encoding genes. *J Biol Chem* **282**, 33659–33670.
- 44 Ettema TJ, Ahmed H, Geerling AC, van der Oost J & Siebers B (2008) The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) of *Sulfolobus solfataricus*: a key-enzyme of the semi-phosphorylative branch of the Entner-Doudoroff pathway. *Extremophiles* **12**, 75–88.
- 45 Welte C & Deppenmeier U (2014) Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetivlastic methanogens. *Biochim et Biophys Acta* **1837**, 1130–1147.
- 46 Satish K, Ferry JG & Maranas CD (2011) Metabolic reconstruction of the archaeon methanogen *Methanosarcina acetivorans*. *BMC Syst Biol* **15**, 5–28.
- 47 Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE & Stahl DA (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1232–1240.
- 48 Saavedra E, Encalada R, Pineda E, Jasso-Chávez R & Moreno-Sánchez R (2005) Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS J* **272**, 1767–1783.
- 49 Sowers KR, Boone JE & Gunsalus RP (1993) Disaggregation of *Methanosarcina* spp and growth as single cells at elevated osmolarity. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3832–3839.
- 50 Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M & Moreno-Sánchez R (2006) Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* **273**, 1975–1988.
- 51 Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Encalada R, Moreno-Sánchez R & Saavedra E (2011) Modeling cancer glycolysis. *Biochim et Biophys Acta* **1807**, 755–767.
- 52 Cayley S, Lewis BA, Guttman HJ & Record MT (1991) Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. Implications for protein-DNA interactions *in vivo*. *J Mol Biol* **222**, 281–300.
- 53 Lira-Silva E, Santiago-Martínez MG, Hernández-Juárez V, García-Contreras R, Moreno-Sánchez R & Jasso-Chávez R (2012) Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PLoS One* **7**, e48779.
- 54 Wong H, Anderson WD, Cheng T & Riabowol KT (1994) Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the “primer-dropping” method. *Anal Biochem* **223**, 251–258.
- 55 Bar-Even A, Noor E & Milo R (2012) A survey of carbon fixation pathways through a quantitative lens. *J Exp Bot* **63**, 2325–2342.
- 56 Mizanur RM, Griffin AKK & Pohl NL (2008) Recombinant production and biochemical characterization of a hyperthermostable α -glucan/maltodextrin phosphorylase from *Pyrococcus furiosus*. *Archaea* **2**, 169–176.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. Primer sequences used in the present study for transcript content determination.

Material suplementario del artículo

1

Table S1. Primer sequences used in this work for transcript content determination

gene	NCBI- GeneID	Enzyme	Sequence	PCR product length (bp)
MA3563	1475456	PFK 1 (Fw)	5' GAAGTACCGGTC'CTCGTCCAT 3'	149
		PFK 1 (Rw)	5' ACCACCTTGGAAGGAATGAG 3'	
MA3344	1475237	FBPase (Fw)	5' CGATGTCGTTCCGGTATGAAG 3'	86
		FBPase (Rw)	5' TTGCAACGATTTTCGAGGTTA 3'	
MA1018	1472908	GAPDH (Fw)	5' GCTATCCACCAGGAGTCCAT 3'	115
		GAPDH (Rw)	5' GCCCAATAGCCTTGTTTGTT 3'	
MA0608	1472500	PPDK (Fw)	5' GTAAGATCTGGTGCCAGGGT 3'	131
		PPDK (Rw)	5' CGGTAGCAATCATAAGCGAA 3'	
MA3890	1475783	PYK (Fw)	5' CGAGGAAGTCCTCAGGAAAC 3'	128
		PYK (Rw)	5' TGTC AAGCTCTTCTGCAACC 3'	
MA1874	1473763	GYP (Fw)	5' AAATGGTTTCCGGAGTTGAC 3'	123
		GYP (Rw)	5' ACCAGCCGTCAAGTACTACTG 3'	
MA3679	1475572	GYS (Fw)	5' GCACTGACGGAGAACTCAA 3'	149
		GYS (Rw)	5' CCCATAGGTTGAACGGATTT 3'	
MA0451	1472343	PGM (Fw)	5'GGGAATTCGTAAACGAGGAA 3'	88
		PGM (Rw)	5'CTTACCGGCGTAACTATCGG 3'	

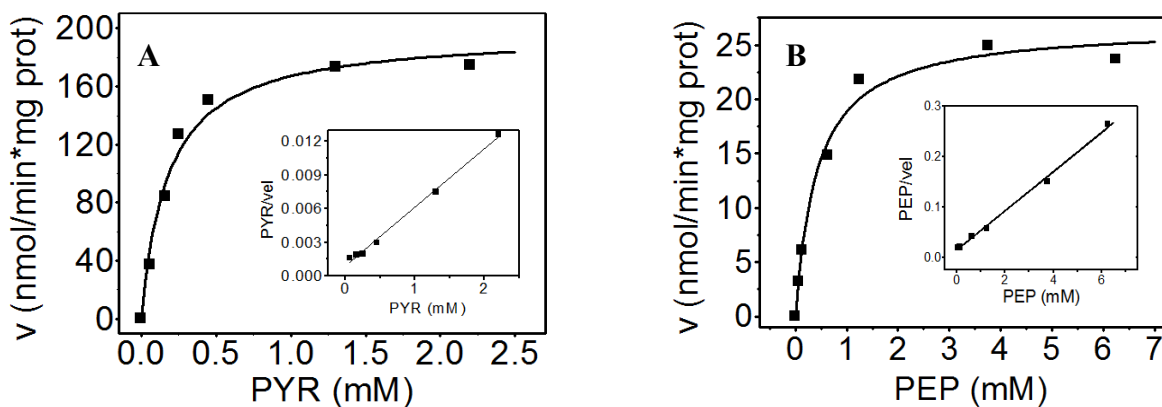
1.6.2. Datos no publicados

A continuación se muestran y discuten algunos resultados que se obtuvieron durante la realización de este proyecto y que no se muestran o se detallan en el artículo.

a) Caracterización cinética de la piruvato fosfato dikinasa (PPDK).

En *M. acetivorans*, la PPDK es una enzima que participa en la gluconeogénesis y en menor grado en la glucólisis ya que su actividad se pudo determinar en las fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas durante 20 y 60 horas (gluconeogénicas y glucolíticas, respectivamente) y en ambos sentidos de la reacción.

Esta enzima participa en la interconversión de piruvato a fosfoenolpiruvato y mostró una cinética hiperbólica, como se muestra en las siguientes gráficas:



Gráfica 1. Cinética hiperbólica de la PPDK de *M. acetivorans* cuando se varía la concentración de piruvato (A) o fosfoenolpiruvato (B) en presencia de concentraciones saturantes de los otros sustratos (ATP y Pi o AMP y PPi, respectivamente). Los insertos muestran el regráfico lineal de Hanes-Woolf indicando una cinética hiperbólica y la ausencia de cooperatividad (ausencia de comportamiento sigmoideal).

En la siguiente tabla se resumen los parámetros cinéticos de la PPDK, donde se observa que esta enzima tiene una afinidad mayor por piruvato que por PEP. Además, la velocidad máxima (V_{max}) hacia la síntesis de PEP fue de 8-10 veces mayor que en el sentido contrario, lo cual indica una cantidad mayor de enzima activa en las células de 20 h de cultivo (gluconeogénesis), dado que este parámetro está definido de la siguiente manera: $V_{max} = [\text{Enzima activa}] \times (k_{cat})$, donde el valor de k_{cat} es una característica cinética que indica la constante catalítica propia de la enzima.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la PPDK de *M. acetivorans*

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
V_{max}_f	251 ± 46	V_{max}_r	27 ± 1
Km_{PYR}	160 ± 20	Km_{PEP}	460 ± 80
Km_{ATP}	110 ± 10	Km_{AMP}	130 ± 20
Km_{Pi}	120 ± 10	Km_{PPi}	180 ± 20
V_{max}_f/Km	1.5	V_{max}_r/Km	0.06

Unidades: V_{max} = nmol/min*mg proteína; Km = μM y V_{max}/Km = mL/min* mg proteína.

Los valores representan la Media ± Desviación estándar de tres experimentos independientes.

Por otra parte, la disponibilidad de los sustratos es una forma de modular la actividad de una enzima en condiciones fisiológicas, por lo tanto, el valor de Km y la concentración intracelular de estos metabolitos son indicativos de la velocidad fisiológica neta de una enzima y sugieren la direccionalidad de la reacción que cataliza. Es importante recalcar que la reversibilidad de una reacción depende del valor de ΔG o la energía libre de Gibbs en condiciones fisiológicas y en una reacción catalizada por una enzima, la velocidad neta de la reacción depende de los valores de Km de los sustratos y de los productos, así como del valor de V_{max} de la reacción en ambos sentidos (Cohn & Yandrasitz, 1980). El

valor de $\Delta G = +8.1$ kJ/mol de la reacción de síntesis de PEP a partir de piruvato fue calculado utilizando el valor de las concentraciones fisiológicas de los productos y sustratos. Este valor indica que esta reacción es reversible fisiológicamente y que depende principalmente de la concentración intracelular de Pi.

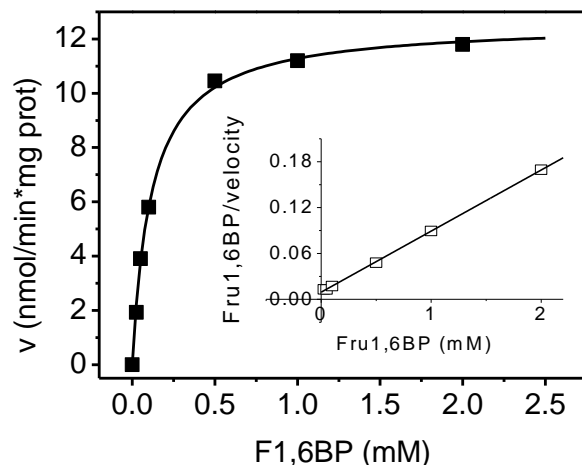
La concentración intracelular de los sustratos de la PPDK (hacia la síntesis de PEP) que fue determinada en células de 20 horas de cultivo: PYR, ATP y Pi (0.5 ± 0.1 , 5.3 ± 0.2 y 188 ± 91 mM, respectivamente), indicó que el PYR se encuentra sub-saturante (3 valores de K_m), mientras que el ATP y el Pi se encuentran en concentraciones saturantes de la enzima (>10 valores de K_m); por lo tanto la disponibilidad de los sustratos no limita la actividad de la PPDK. En las concentraciones analizadas (<5 mM), el Pi no inhibió la actividad de la PPDK, sin embargo, la concentración intracelular de este metabolito es muy alta y podría tener un efecto sobre la actividad (inhibición por sustrato).

La eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) es un parámetro cinético propio de una enzima e indica la preferencia de catálisis de un sustrato por una enzima. El valor de la eficiencia catalítica de la PPDK indicó que la reacción hacia la síntesis de PEP está más favorecida que en sentido contrario, ya que su valor es aproximadamente 25 veces mayor que el sentido de síntesis de piruvato. Estos resultados sugirieron que en la célula, la PPDK lleva a cabo preferencialmente la reacción de síntesis de PEP en condiciones gluconeogénicas.

b) Caracterización cinética y la modulación de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FruBPasa) por AMP y citrato.

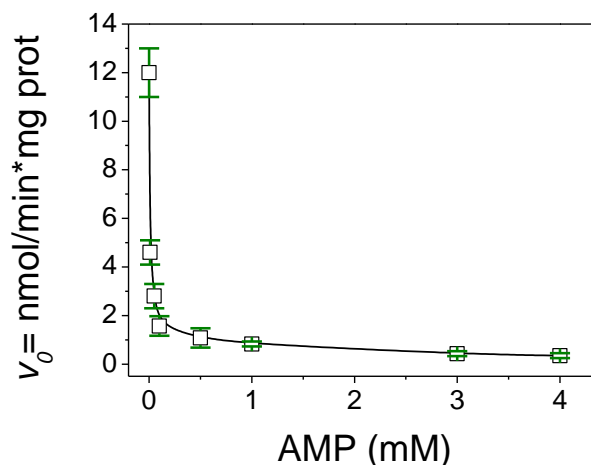
La FruBPasa es una enzima que participa exclusivamente en la gluconeogénesis, ya que su actividad está presente sólo en fracciones citosólicas enriquecidas de células de 20 horas de

cultivo. La FruBPasa de *M. acetivorans* mostró una cinética hiperbólica, como se muestra en la siguiente gráfica:



Grafica 2. Cinética hiperbólica de la FruBPasa de *M. acetivorans* cuando se varía la concentración de su sustrato (Fructosa 1,6-bisfosfato). Los insertos muestran el regráfico lineal de Hanes-Woolf indicando una cinética hiperbólica y la ausencia de cooperatividad (ausencia de comportamiento sigmoidal).

De acuerdo con el valor de K_m (0.11 ± 0.01 mM) y la concentración intracelular de Fru1,6BP en células de 20 horas de cultivo (1.8 ± 0.2 mM), en la célula y en ausencia de inhibidores, la FruBPasa se encuentra trabajando en condiciones de V_{max} ; sin embargo, la velocidad de esta enzima es modulada fuertemente por concentraciones fisiológicas de AMP, como se muestra en la gráfica 3.

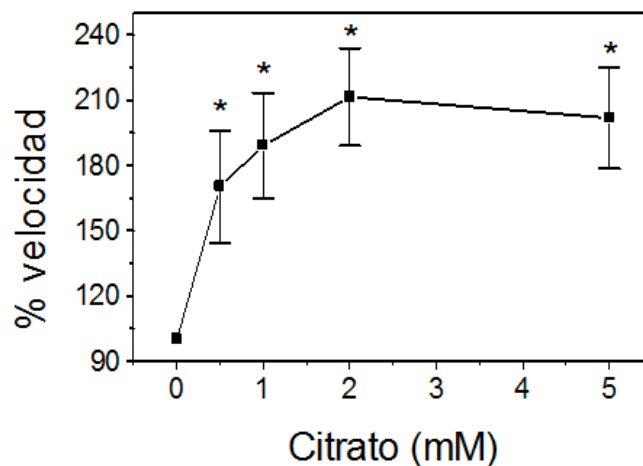


Gráfica 3. Modulación de la velocidad de la FruBPasa de *M. acetivorans* por AMP.

Los valores representan la Media \pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

El valor de IC_{50} del AMP (0.06 ± 0.01 mM. Media \pm D.E.; $n=3$) determinado en las fracciones citosólicas enriquecidas sugiere que en la célula la velocidad de esta enzima se encuentra inhibida entre un 96-98% en concentraciones fisiológicas de AMP (3-4 mM). Por lo tanto, la velocidad restante podría definir la magnitud del flujo gluconeogénico. Este tipo de modulación ha sido reportada para la FruBPasa (Tipo IV) recombinante de *Pyrococcus furiosus* donde su actividad fue inhibida en concentraciones no fisiológicas de AMP pero sí de ADP y ATP ($IC_{50}=30, 3$ y 4 mM, respectivamente) (Verhees *et al.*, 2002); sin embargo, no se ha evaluado el efecto de la inhibición de esta enzima sobre el flujo metabólico.

Hasta el momento no se ha reportado la existencia de activadores de las FruBPasas de arqueas (Verhees *et al.*, 2002; Bräsen *et al.*, 2014), no obstante, en *M. acetivorans*, el citrato tuvo la capacidad de aumentar la velocidad de esta enzima en concentraciones saturantes y fisiológicas del sustrato (1.5 mM de Fru1,6BP= 12 valores de K_m), con un valor de $K_{0.5}=0.3$ mM, como se muestra en la gráfica 4.

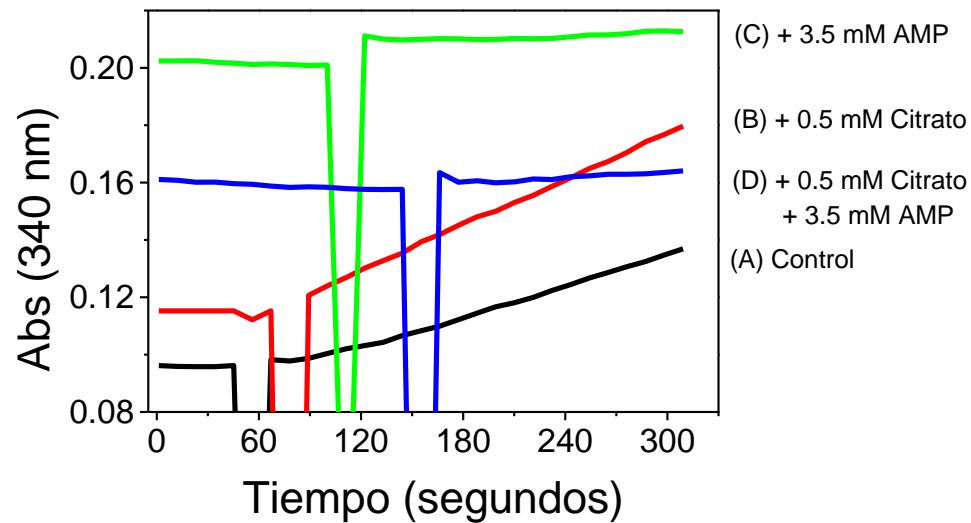


Grafica 4. Efecto del citrato sobre la velocidad de la FruBPasa en extractos de *M. acetivorans*. Los ensayos se realizaron en presencia de 1.5 mM de F1,6BP (>10 valores de K_m y cercana a la concentración intracelular). Los valores fueron normalizados considerando que el 100% de velocidad fue igual a 12 ± 1 nmol/min x mg proteína. Los valores representan la Media \pm Desviación estándar de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs 0 mM Citrato. Prueba *t-Student* para muestras independientes.

Aunque la concentración intracelular de citrato varía entre 2 y 0.5 mM (Lira-Silva *et al.*, 2013; Santiago-Martínez *et al.*, 2017,manuscrito en preparación) dependiendo del estado metabólico de la célula (gluconeogénico o glucolítico), el citrato podría favorecer la actividad de la FruBPasa y tener un efecto sobre el flujo gluconeogénico cuando hay una fuente de carbono externa disponible. La velocidad de la FruBPasa en presencia de 3.5 mM de AMP y de 1.5 mM de Fru1,6BP fue de 0.5 nmol/min x mg proteína, la cual representa el 4% de la velocidad medida en ausencia del inhibidor. En comparación, la velocidad de esta enzima aumenta un 80% en presencia de 0.5 mM de citrato, 3.5 mM de AMP y 1.5 mM de Fru1,6BP ($v_0 = 0.9 \pm 0.2$ nmol/min x mg proteína; Media \pm D.E.; n=3). La concentración

determinada en las células sugiere que el citrato no solo aumenta la velocidad de la FruBPasa, sino también disminuye el efecto inhibitorio del AMP.

A continuación se muestra un trazo representativo donde se determinó el efecto del citrato y el AMP sobre la velocidad de la FruBPasa en las fracciones citosólicas enriquecidas de *M. acetivorans* (Gráfica 5).



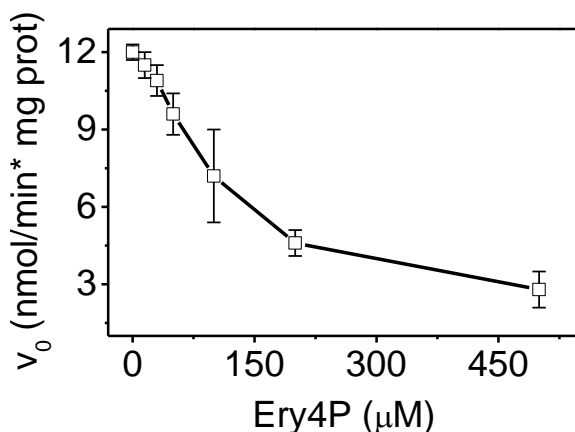
Gráfica 5. Trazo representativo del efecto del citrato y el AMP sobre la velocidad de la FruBPasa en extractos de *M. acetivorans*. A) Actividad en ausencia de moduladores = 12 nmol/min* mg proteína. B) Actividad en presencia de 0.5 mM de citrato = 18 nmol/min* mg proteína. C) Actividad en presencia de 3.5 mM de AMP = 0.5 nmol/min* mg proteína. D) Actividad en presencia de 0.5 mM de citrato + 3.5 mM de AMP = 0.9 nmol/min* mg proteína. Los ensayos se realizaron en presencia de 1.5 mM de Fru1,6BP y usando 0.15 mg de proteína citosólica para A y B y 0.55 mg de proteína citosólica para C y D.

Estos resultados sugieren que en concentraciones fisiológicas el AMP y el citrato modulan la velocidad de la FruBPasa y este paso enzimático podría ser un punto importante de control del flujo gluconeogénico.

c) Modulación de la hexosa fosfato isomera (HPI) por eritrosa 4-fosfato

La HPI es una enzima que participa tanto en la gluconeogénesis como en la glucólisis de *M. acetivorans*, ya que cataliza una reacción reversible y su actividad se pudo determinar en ambas condiciones experimentales (fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas durante 20 y 60 horas). Esta enzima participa en la interconversión de glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato y se ha reportado que en células de mamífero esta enzima puede ser modulada por concentraciones bajas de eritrosa 4-fosfato ($K_i = 0.8\text{--}2.5 \mu\text{M}$) y 6-fosfogluconato ($K_i = 6.8\text{--}18 \mu\text{M}$) (Marín-Hernández *et al.*, 2011).

La velocidad de la HPI de *M. acetivorans* fue inhibida por la eritrosa 4-fosfato, un metabolito de la vía de las pentosas, como se muestra a continuación:

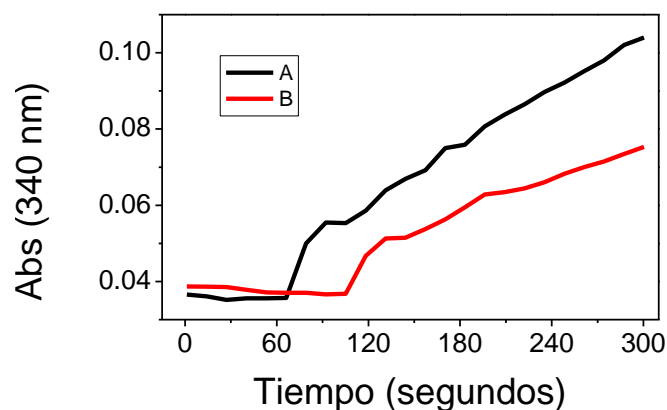


Gráfica 6. Modulación de la HPI de *M. acetivorans* por eritrosa 4-fosfato (Ery4P).

Los valores representan la Media \pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

El valor de IC_{50} de la eritrosa 4-fosfato ($0.15 \pm 0.04 \text{ mM}$; Media \pm D.E.; $n=3$) determinado en las fracciones citosólicas enriquecidas sugiere que en la célula la velocidad de esta enzima se encuentra inhibida entre un 50-60% en concentraciones fisiológicas de su sustrato (1.2 mM de Fru6P) y de eritrosa 4-fosfato (0.17-0.3 mM).

A continuación se muestra un trazo representativo de la determinación del efecto de la eritrosa 4-fosfato sobre la velocidad de la HPI en extractos de *M. acetivorans*, en el cual el efecto inhibitorio de este metabolito no es muy evidente debido a que fue necesario utilizar una cantidad mayor de proteína citosólica en el ensayo enzimático para poder detectar una actividad confiable en presencia del inhibidor; sin embargo, cuando esta v_0 es normalizada por mg de proteína, el efecto inhibitorio es más evidente (Gráfica 6).



Gráfica 7. Trazo representativo del efecto de la eritrosa 4-fosfato (Ery4P) sobre la velocidad de la HPI en extractos de *M. acetivorans*. A) Actividad en ausencia del modulador = 11 nmol/min* mg proteína. B) Actividad en presencia de 0.2 mM de Ery4P = 5 nmol/min* mg proteína. Los ensayos se realizaron en presencia de 1.2 mM de Fru6P (concentración fisiológica) y usando 0.18 mg de proteína citosólica para A y 0.5 mg de proteína citosólica para B.

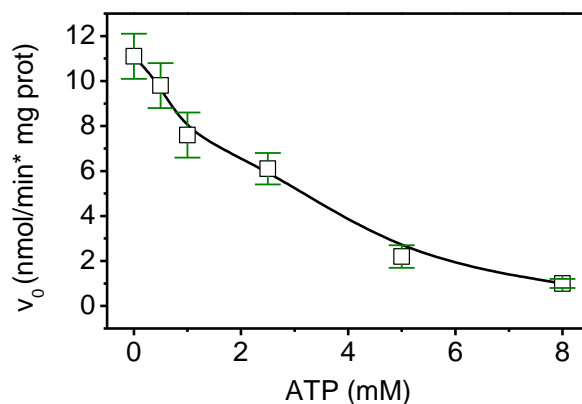
La eritrosa 4-fosfato es un intermediario de la vía de las Pentosas Fosfato y del Ciclo de Calvin, donde es sintetizada por una transaldolasa y metabolizada por una transcetolasa (Nelson & Cox, 2017). En *M. acetivorans* no se ha descrito una vía de síntesis de Ery4P (Galagan *et al.*, 2002), aunque no se descarta la posibilidad de la existencia de enzimas que puedan sintetizar y degradar esta tetrosa y su interconexión con otras vías, tales como la glucólisis y gluconeogénesis. En *E. coli* existe la enzima 3-Desoxi-D-arabinoheptulose 7-fosfato (DAHP) sintasa (EC 2.5.1.54), la cual participa en la vía de

biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano, conocida también como la vía de shikimato. Esta transferasa cataliza la síntesis de 3-deoxi-D-arabino-hept-2-ulosonato 7-fosfato + fosfato a partir de PEP y D-eritrosa 4-fosfato (Schoner & Herrmann, 1976). No obstante, ni la enzima ni la vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos han sido descritas en metanogénicos.

Hasta el momento no se ha reportado la existencia de moduladores de la velocidad de la hexosa fosfato isomerasa (HPI) en organismos metanogénicos (Bräsen *et al.*, 2014); sin embargo, la inhibición de la HPI por concentraciones fisiológicas de eritrosa 4-fosfato sugiere que esta enzima, podría ser un punto importante en el control del flujo tanto de la vía gluconeogénica como glucolítica.

d) Modulación de la piruvato kinasa (PYK) por ATP y otros metabolitos.

La PYK es una enzima que participa exclusivamente en la glucólisis, ya que su velocidad (enzima activa) sólo se pudo determinar en fracciones citosólicas enriquecidas de células de 60 horas de cultivo. La PYK de *M. acetivorans* tiene una cinética hiperbólica cuando se varía la concentración de piruvato en presencia de concentraciones saturantes de ADP. Las gráficas con ajustes hiperbólicos y sus respectivos regráficos lineales fueron mostradas en el artículo, pero el efecto de algunos posibles moduladores no fue detallado y se muestran a continuación (gráfica 7 y 8).

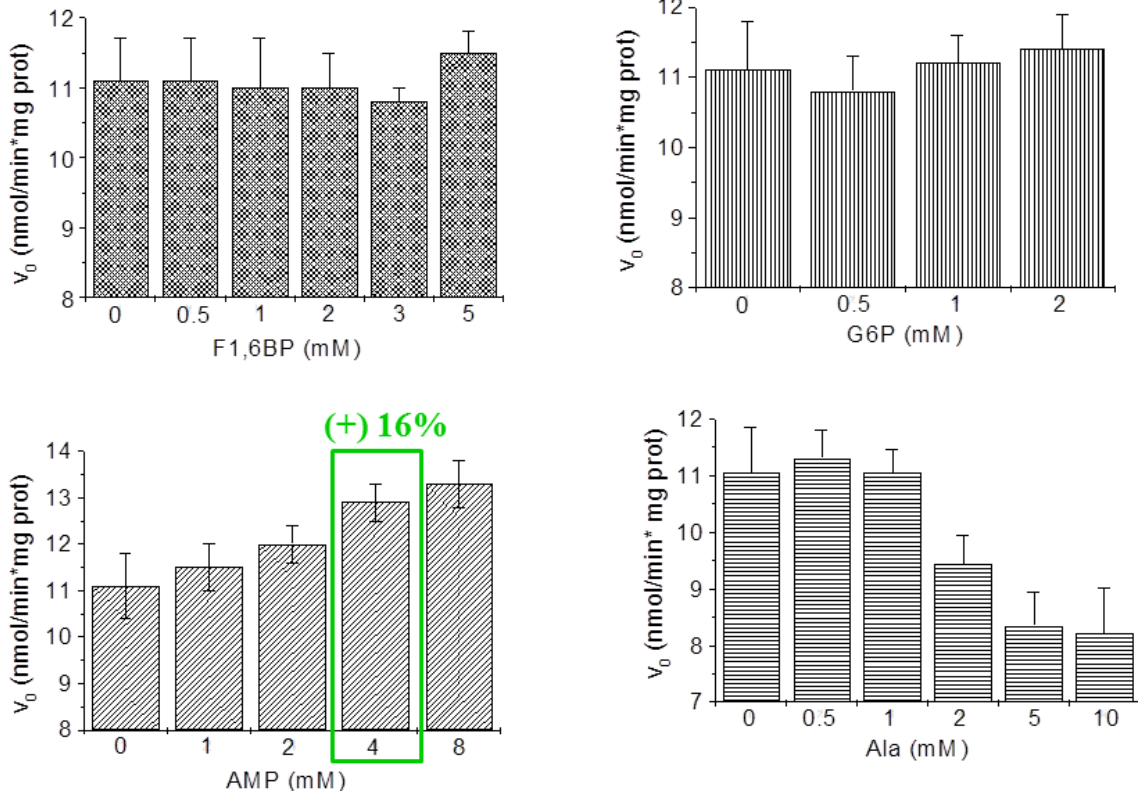


Gráfica 8. Modulación de la PYK de *M. acetivorans* por ATP.

Los valores representan la Media \pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

El valor de IC_{50} del ATP (2.4 ± 0.1 mM; Media \pm D.E.; $n=3$) determinado en las fracciones citosólicas enriquecidas de células de 60 horas de cultivo sugiere que en la célula la velocidad de esta enzima se encuentra inhibida entre 40-50% en concentraciones fisiológicas de ATP (3.5 ± 0.9 mM).

La Fru1,6BP (0.5- 5 mM) y Glc6P (0.5- 2 mM) no tuvieron efecto sobre la velocidad de la PYK. El AMP en concentraciones fisiológicas (4 mM) aumentó solo 16% la velocidad de la PYK de células de 60 horas de cultivo. La alanina inhibió la velocidad de la enzima en concentraciones superiores a 2 mM; sin embargo, no se ha determinado el contenido intracelular de este aminoácido por lo que su función en la modulación de la velocidad de esta enzima aún no es clara.



Gráfica 9. Modulación de la PYK de *M. acetivorans* por diferentes metabolitos.

Los valores representan la Media \pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

En células de 60 horas de cultivo hay una cantidad mayor de PYK activa en relación a la PPDK. Si se comparan los parámetros cinéticos de estas dos enzimas que podrían estar involucradas en la síntesis de piruvato a partir de PEP (Tabla 3), se observa que la PYK no solo es más afín al PEP, sino que además tiene una eficiencia catalítica siete veces mayor que la PPDK.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la PYK y PPK de *M. acetivorans*

PYK		PPDK	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
$Vmax_f$	11 ± 0.4	$Vmax_r$	3.3 ± 0.2
Km_{PEP}	220 ± 10	Km_{PEP}	460 ± 80
$Vmax_f/Km$	0.05	$Vmax_r/Km$	0.007

Unidades: $Vmax$ = nmol/min*mg proteína; Km = μ M y $Vmax/Km$ = mL/min* mg proteína.
Los valores representan la Media \pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

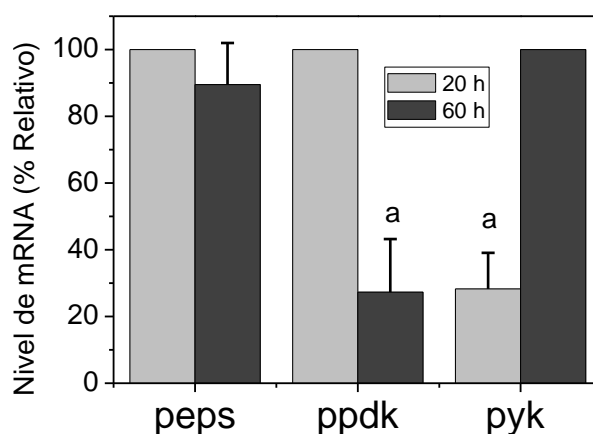
La modulación de la velocidad de la PYK tiene una gran relevancia fisiológica, ya que su velocidad se detectó en fracciones citosólicas enriquecidas de células glucolíticas y tiene una contribución importante en la síntesis de ATP a partir de la degradación de glucógeno. En comparación, la PPK tiene una función predominante en las células gluconeogénicas para la síntesis de PEP, aunque no se descarta su participación en la catálisis de la reacción en el sentido reverso.

e) Papel de la PEP sintetasa y la GAPN en *M. acetivorans*

En algunos microorganismos, el PEP se sintetiza a partir del piruvato en una reacción dependiente de ATP y catalizada por la enzima PEP sintetasa (PEPS; EC 2.7.9.2). Esta enzima es esencial para el crecimiento y la duplicación de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* en fuentes de carbono gluconeogénicas, tales como piruvato, lactato y alanina (Cooper & Kornberg, 1967; Smyer & Jeter, 1989). En el arqueon hipertermófilo *Thermoproteus tenax*, la PEPS cataliza la conversión unidireccional de piruvato a PEP,

mientras la PPDK tiene una velocidad bidireccional con una preferencia para la reacción de síntesis de Piruvato a partir de PEP, PPi y AMP (Tjaden *et al.*, 2006).

En el genoma de *M. acetivorans* se encuentra anotado un gen que podría codificar para una PEPS (Galagan *et al.*, 2012). En la gráfica 9, se muestran los niveles de transcrito que fueron determinados para los genes hipotéticos que codifican para las enzimas que podrían participar en la interconversión de PYR a PEP. Se determinaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de *ppdk* y *pyk* en las dos condiciones experimentales, sugiriendo la expresión diferencial de estos genes dependiendo del estado nutricional y metabólico de las células.



Gráfica 10. Nivel de mRNA de genes involucrados en la posible interconversión de PEP a PYR. El cDNA utilizado fue sintetizado a partir del RNA total aislado de las células cultivadas durante 20 h (gris claro) o 60 h (gris oscuro). El análisis densitométrico fue hecho con una doble normalización. Primero, cada gen fue normalizado con su control de carga (GAPDH) y posteriormente, para cada par de condiciones experimentales, el 100% de nivel de mRNA es la muestra con la señal de intensidad mayor. Los valores representan la Media \pm Desviación estándar de tres experimentos independientes. ^a $P < 0.01$ versus la condición fijada como 100%. (Prueba *t* de Student para muestras independientes).

El contenido de transcrito de *peps* fue muy similar (gráfica 9) en ambas condiciones experimentales (células gluconeogénicas y glucolíticas), sugiriendo una expresión constante de este gen; sin embargo, la velocidad de la PEPS en las fracciones citosólicas enriquecidas de células cultivadas durante 20 y 60 horas fue muy baja (1.6 ± 0.2 y 0.6 ± 0.2 nmol/min*mg proteína, respectivamente). En comparación con la actividad de la PPK, esta velocidad representa solo el 6-10%. Dichos valores sugieren que ambas enzimas pueden ser las responsables de la síntesis de PEP, pero la PPK es la enzima que participa preferencialmente en su síntesis en las células de 20 horas de cultivo.

Por otra parte, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante o GAPN (EC 1.2.1.9) cataliza la reacción irreversible de gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato por la reducción de NADP^+ a NADPH, la cual no conlleva la síntesis del 1,3-bisfosfoglicerato ni de ATP por fosforilación a nivel de sustrato. Esta enzima es importante en la regulación de la vía EMP y ED de degradación del carbono en organismos hipertermófilos, tales como: *Thermoproteus tenax*, *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus tokodaii*; sin embargo, la presencia de esta enzima y su función no ha sido demostrada en metanogénicos (Bräsen *et al.*, 2014). En el genoma secuenciado de *M. acetivorans* no se ha reportado la presencia del gen que podría codificar para esta proteína y su actividad no fue detectada en ninguna condición experimental, por lo que se descarta su participación en la glucólisis en este organismo (Galagan *et al.*, 2002; Santiago-Martínez *et al.*, 2016).

1.7. DISCUSIÓN GENERAL

La atmósfera terrestre comenzó a formarse hace unos 4,600 millones de años con el nacimiento de nuestro planeta y su evolución ha tenido repercusiones sobre las diversas formas de vida y sus adaptaciones a cambios ambientales drásticos. Una de las hipótesis más aceptadas indica que la atmósfera de la Tierra primitiva estaba formada por vapor de agua, dióxido de carbono (CO_2) y nitrógeno, así como cantidades pequeñas de hidrógeno (H_2) y monóxido de carbono (CO) pero con ausencia de oxígeno libre. Esta atmósfera ligeramente reductora pudo haber favorecido el origen y la sobrevivencia de organismos anaerobios con la capacidad de obtener energía a partir de moléculas muy simples, tales como los primeros organismos metanogénicos.

En 1990, Wächtershäuser propuso la existencia de una forma primitiva del metabolismo autotrófico. En su trabajo, Wächtershäuser definió al metabolismo como un ciclo de reacciones químicas que produce energía en una forma que puede ser aprovechada por otros procesos con la finalidad de originar compuestos cada vez más complejos. La idea clave de la teoría de Wächtershäuser es que la química primitiva de la vida no ocurrió en los océanos, sino en la superficie de minerales (por ejemplo, la pirita) presentes en las fuentes hidrotermales, en un ambiente anaeróbico y de temperaturas y presión muy altas.

Wächtershäuser propuso que el acetato pudo haber sido un precursor de moléculas más complejas. Según esta hipótesis, la producción de acetato se llevó a cabo mediante la catálisis por iones metálicos. Posteriormente, hubo una reacción de carboxilación para la formación de moléculas de tres carbonos, tales como el piruvato, y posteriormente se formaron moléculas de un tamaño mayor y complejidad, como las proteínas y los

carbohidratos. Además, Wächtershäuser propone una teoría metabólica donde la pirita se convierte en un primer catalizador de reacciones químicas del metabolismo primitivo.

La diferencia principal con la Teoría de Oparin-Haldane es que ésta última propone una naturaleza heterotrófica de los primeros organismos. La Teoría heterotrófica esta basada en la capacidad de los organismos actuales para fermentar compuestos y obtener energía (ATP) a través de la fosforilación a nivel de sustrato (Lazcano & Miller, 1999).

Oparin se imaginó que las altas temperaturas del planeta, la participación de los rayos ultravioleta, las descargas eléctricas en la atmósfera y la presencia de hidrógeno, metano y amoníaco podrían haber provocado reacciones químicas entre los elementos carbono, hidrógeno y nitrógeno, los cuales, además del oxígeno presente en baja concentración en la atmósfera primitiva y más abundantemente en el agua, fueron los materiales de base para la evolución de la vida, siendo esas reacciones las que darían el origen a los aminoácidos y otras moléculas orgánicas.

En general, ambas hipótesis están basadas en la existencia actual de algunos organismos con la capacidad de obtener energía tanto de manera autotrófica como heterotrófica, tales como los organismos metanogénicos, los cuales pueden utilizar diferentes compuestos carbonados para la obtención de energía a través de la metanogénesis.

El objetivo inicial de este proyecto fue la caracterización de la gluconeogénesis en el arqueon marino *Methanosarcina acetivorans*. En estos organismos esta vía ha sido poco estudiada a pesar de lo relevante que resulta para la síntesis de biomoléculas y de polisacáridos de reserva en microorganismos que crecen en fuentes de carbono diferentes a las hexosas. Durante el desarrollo del proyecto y con base en los resultados experimentales que se obtuvieron, se propuso incluir el estudio de la vía glucolítica y del metabolismo del

glucógeno, ya que estas vías participan de manera importante en el metabolismo central de nuestro modelo de estudio.

La síntesis y la degradación de glucógeno sugirieron la existencia de un flujo unidireccional de la gluconeogénesis y la glucólisis estrechamente relacionada con el metabolismo del glucógeno. A su vez, el contenido intracelular de glucógeno está regulado por la disponibilidad de la fuente de carbono externa. Estos resultados sugirieron la presencia de una regulación concertada entre ambas vías que favorece el flujo unidireccional (ver sección de resultados del artículo publicado).

La determinación de los parámetros cinéticos (V_{max} , K_m , V_{max}/K_m) de las enzimas que mostraron un cambio en su actividad (v_0 , velocidad inicial) en fracciones citosólicas enriquecidas de células de 20 horas (PPDK, FruBPasa y GYS) y 60 horas de cultivo (GYP y PGM, ADP-PFK1 y PYK) así como los valores de K_i o IC_{50} de intermediarios metabólicos nos permitieron conocer la regulación metabólica de las enzimas involucradas en ambas vías.

La inhibición de la velocidad de la HPI por concentraciones fisiológicas de Eritrosa 4-fosfato y de la FruBPasa por AMP permitieron proponer a estos pasos como los puntos importantes de regulación de la vía gluconeogénica. La inhibición de la velocidad de la FruBPasa por AMP podría ser importante en condiciones donde hay presencia de enzima activa de ADP-PFK1 y FruBPasa al mismo tiempo, como probablemente sucede en la fase estacionaria temprana, donde comienza a disminuir el flujo gluconeogénico, debido a que la fuente de carbono externa comienza a ser limitante. La inhibición de la velocidad de la ADP-PFK1 y PYK por concentraciones fisiológicas de ATP y AMP, permitieron sugerir que la HPI, PYK y principalmente la ADP-PFK1 serían puntos importantes de regulación de la vía glucolítica. Además, la ADP-PFK1, PYK y FruBPasa de *M. acetivorans* no

presentan una regulación alostérica clásica ni una cinética sigmoideal (ausencia de cooperatividad) como sucede con sus contrapartes en las células eucariontes (Schafer & Schönheit, 1993). Por otro lado, los niveles de transcritos coincidieron con la presencia o ausencia de la enzima activa y de los flujos metabólicos en las células de 20 ó 60 horas de cultivo, exceptuando la ADP-PFK1 donde el mRNA disminuyó solo un 13% en células de 20 versus 60 horas de cultivo. Este resultado sugirió que la vida media del transcrito para la ADP-PFK1 es mayor y/o que la regulación principal de este paso es a nivel post-traducciona (enzima inactiva o degrada) ó a nivel metabólico (inhibición de la velocidad por ATP y AMP).

La determinación de la actividad de la Monóxido de carbono deshidrogenasa/Acetil-CoA sintasa sugirió que esta enzima sintetiza el acetil-CoA a partir del metil-H₄SPT, CO₂ y Fd_{red}. La función similar de esta enzima también se ha reportado para *M. thermophila* (Abbanat & Ferry, 1990). En *M. acetivorans*, el acetil-CoA producido por la CODH/AcS es utilizado por la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) + CO₂ para generar piruvato y dar inicio a la gluconeogénesis. La concentración intracelular de los sustratos y productos de esta enzima, principalmente la Fd_{red} ($E^{0'} = -420/-500$ mV) y el CO₂, dan el sentido a la reacción hacia la síntesis de piruvato cuando hay disponibilidad de una fuente de carbono externa, como se ha reportado en otros microorganismos (Furdui & Ragsdale, 2000).

Durante la fase exponencial de crecimiento (20 horas) hubo síntesis de ATP vía metanogénesis a partir de la fuente de carbono externa; sin embargo, a partir de las 60 horas de cultivo, el glucógeno se utilizó para la síntesis de ATP por fosforilación a nivel de sustrato mediante la glucólisis (PGK y PYK) y la síntesis de acetato (vía Pta-AcK). Una gran parte (>98%) del carbono proveniente del glucógeno, permitió la síntesis de ATP vía

metanogénesis permitiendo mantener la homeostasis celular. Estos resultados permitieron proponer que en la fase estacionaria de crecimiento y cuando no hay una fuente de carbono externa disponible, la principal vía de síntesis de ATP sigue siendo la metanogénesis (66%), seguida de la glucólisis (33.9%), mientras que la fosforilación a nivel de sustrato por la vía Pta-AcK solo aporta una cantidad muy pequeña de ATP (0.04%). Satish-Kumar *et al.*, (2011) reportaron que el ATP generado por fosforilación a nivel de sustrato (Pta/AcK) no es suficiente para permitir el crecimiento de *M. acetivorans*.

Debido a que los organismos metanogénicos consumen aproximadamente el 90% de la fuente de carbono para la síntesis de ATP vía metanogénesis y el resto lo utilizan para la generación de biomasa, la capacidad para almacenar energía (glucógeno) podría dar una ventaja a estos organismos para sobrevivir en condiciones ambientales adversas, tales como la ausencia de una fuente de carbono externa. Además, la regulación jerárquica (niveles diferentes) y concertada de las vías metabólicas permite una mejor asimilación del carbono a fin de mantener la homeostasis celular. Esta regulación permitiría que la célula pueda tener una respuesta (rápida o transitoria) para tolerar y resistir la presencia de algunos tipos de estrés, tales como la exposición a metales pesados u oxígeno, donde se requiere de la síntesis *de novo* de macromoléculas y de biopelícula (Lira-Silva *et al.*, 2013, Jasso-Chavéz *et al.*, 2015).

El conocimiento de la regulación de la gluconeogénesis/glucólisis en *M. acetivorans* permite proponer los puntos que en un futuro pueden ser modificados o reemplazados para aumentar la biomasa celular y aumentar la velocidad de síntesis de metano, ya que este gas puede ser utilizado como un biocombustible renovable.

Por último, este proyecto ha permitido comprender que una forma elemental de producir grandes cantidad de gas metano es manteniendo disponible la fuente de carbono

externa (metanol o compuestos metilados). Debido a que las vías metabólicas en *M. acetivorans* (y quizá en otros metanogénicos) están reguladas a nivel metabólico y transcripcional, probablemente algunas estrategias de Ingeniería de Vías Metabólicas no serían exitosas, sobre todo en aquellas donde la asimilación de los esqueletos de carbono o el estado energético se vean comprometidos y pongan en riesgo la homeostasis celular, por ejemplo, si esa modificación requiere de la síntesis *de novo* de proteínas o un gasto energético elevado (gasto de ATP o enlaces de alta energía).

1.8. CONCLUSIONES

En *M. acetivorans*, existe una regulación jerárquica y concertada de las vías metabólicas que permite una mejor asimilación del carbono a fin de mantener la homeostasis celular. Esta regulación permitiría que la célula pueda tener una respuesta (rápida o transitoria) para tolerar y resistir la presencia de algunos tipos de estrés.

En vista de la ausencia aparente de enzimas cooperativas, las modificaciones post-traduccionales podría proveer una regulación a mediano plazo de los flujos metabólicos de *M. acetivorans*, con la finalidad de mantener la homeostasis celular. Además, la regulación metabólica podría proveer la modulación rápida de los flujos glucolítico y gluconeogénico cuando las células se encuentran en estrés nutricional.

PARTE 2: Regulación de la actividad de ADP-PFK1 y FruBPasa II en el flujo gluconeogénico y glucolítico de *Methanosarcina acetivorans*.

2. 1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Características generales y función de la PFK1 y FruBPasa en el metabolismo de carbohidratos en microorganismos

En la vía glucolítica clásica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la producción neta de energía es de 2 moles de ATP por 1 mol de glucosa oxidada a piruvato. En cambio, en la vía Entner-Doudoroff (ED) el rendimiento es menor, ya que solo se genera 1 mol de ATP por cada mol de glucosa oxidada a piruvato (Siebers and Schönheit, 2005). En algunas arqueas se ha descrito la presencia de varios pasos modificados de las vías EMP y ED, los cuales son catalizados por enzimas inusuales que carecen de una estructura y regulación clásica, como sus contrapartes descritas en organismos de *Bacteria* y *Eukarya*.

La asimilación eficiente de carbono por medio de la glucólisis y la gluconeogénesis no solo es necesaria para la duplicación celular sino también para resistir ante diferentes tipos de estrés, como la privación de nutrientes (Zevenhuizen, 1992; Borges *et al.*, 2006; Santiago-Martínez *et al.*, 2016), temperaturas altas o bajas, intervalos variados de pH (Gochevaet *et al.*, 2006; Koerdt *et al.*, 2010), osmolaridad alta o baja (Srivastava and Kowshik, 2013), la presencia de metales pesados (Koerdt *et al.*, 2010; Lira-Silva, *et al.*, 2013) y el estrés oxidante o la presencia de O₂ (Jasso-Chávez *et al.*, 2015).

Por análisis filogenéticos de la distribución de las enzimas de la vía Embden-Meyerhof-Parnas dentro de algunas especies de los Dominios *Archaea* y *Bacteria* se ha propuesto a la gluconeogénesis como una vía ancestral del metabolismo de carbohidratos (Ronimus & Morgan, 2003).

Hasta el momento, los estudios sobre el metabolismo de carbohidratos en el Dominio *Archaea* se han enfocado principalmente en la caracterización de la estructura de las vías de degradación de hexosas y pentosas debido a que muchos organismos halófilos e hipertermófilos pueden crecer en carbohidratos como maltosa, almidón, celulosa y quitina. En cambio, los metanogénicos y algunos hipertermófilos que no utilizan carbohidratos, pueden utilizar sustratos para su crecimiento, tales como: aminoácidos (peptona), piruvato, lactato, formato, sulfuro, H₂, H₂/CO₂, acetato, metanol y algunos otros compuestos metilados (Kletzin, 2007; Bräsen *et al.*, 2014).

Los resultados del análisis transcripcional, cinético y fisiológico del metabolismo central de carbohidratos indican que en *M. acetivorans* el estado nutricional regula algunos pasos claves de las vías gluconeogénica y glucolítica así como del metabolismo del glucógeno, tanto a nivel transcripcional como metabólico. Sin embargo, en este trabajo no se evaluó la cantidad total de proteína ni la existencia de una regulación mediada por modificaciones post-traduccionales. En miembros del Dominio *Archaea* se ha identificado cerca de una docena de proteínas que son sujetas a procesos de fosforilación y desfosforilación (Eichler & Adams, 2005). Dos de estas proteínas, la fosfohexo mutasa y la D-gluconato deshidratasa están involucradas en el metabolismo de carbohidratos de la arquea hipertermófila *Sulfolobussulfataricus* (Ray *et al.*, 2005; Kin & Lee, 2005), lo que sugiere que en *M. acetivorans* también podrían existir modificaciones post-traduccionales que regulen la actividad de algunas enzimas del metabolismo de carbohidratos.

En experimentos *in silico*, utilizando algunos programas que predicen los mecanismos de regulación post-traduccionales a partir de la secuencia de aminoácidos (KinasePhos, <http://KinasePhos.mbc.nctu.edu.tw/>), se determinó que tanto la ADP-PFK1 como la FruBPasa II podrían estar reguladas por procesos de fosforilación y

desfosforilación (Huang et al., 2005). Debido a la gran relevancia que podría tener el estudio de la regulación de las vías metabólicas en metanogénicos, en la segunda parte del proyecto se realizó la clonación heteróloga y la sobre-expresión de los genes *pfkI* (MA3563) *yfbpase II* (MA1152) de *M. acetivorans* con el objetivo de evaluar los mecanismos de regulación post-traducciona l y metabólica de la FruBPasa II y ADP-PFK1 y su papel en la regulación de las vías de síntesis y degradación de carbohidratos.

Algunos organismos del Dominio *Archaea* (organismos *Euryarchaeota* anaeróbicos y los metanogénicos que sintetizan y acumulan glucógeno) utilizan una PFK1 dependiente de ATP, ADP o PPi (Verhees et al., 2001; Santiago-Martínez et al., 2016) en la vía glucolítica (Figura 1).

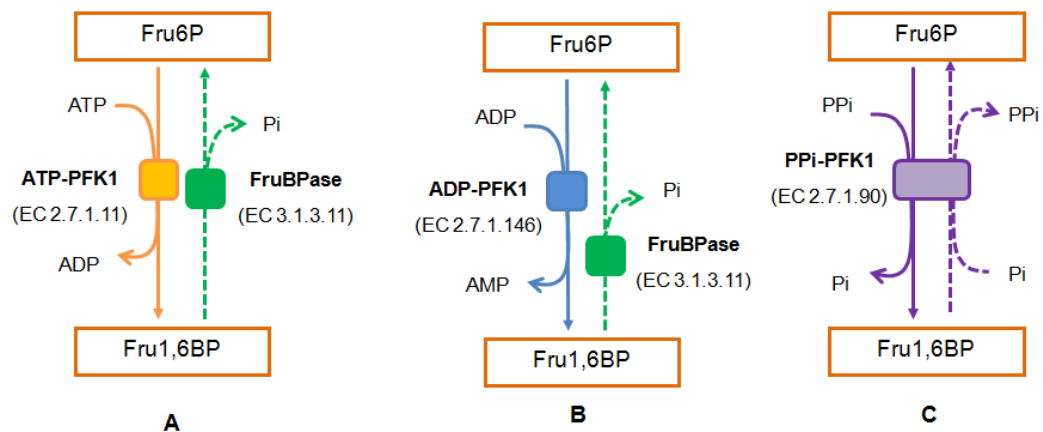


Figura 5. Enzimas involucradas en la interconversión de Fru6P a Fru1,6BP. En el esquema se indican las reacciones catabólicas (líneas), las reacciones anabólicas (líneas punteadas) y el número EC (*Enzyme Commission number*) para cada proteína. En fuentes de carbono glucolíticas, (A) algunas especies de *Eukarya* y *Bacteria* utilizan una ATP-PFK1 (EC 2.7.1.11) clásica e irreversible; en cambio, (B) los organismos *Euryarchaeota* anaeróbicos y los metanogénicos que sintetizan y acumulan glucógeno utilizan una ADP-PFK1 (EC 2.7.1.146). Estos organismos pueden usar una FruBPasa I-IV (EC 3.1.3.11) irreversible para la desfosforilación de la Fru1,6BP en condiciones de crecimiento gluconeogénico. (C) Por otra parte, *Crenarchaeota* (*Thermoproteus*), algunas bacterias, protistas y plantas utilizan una PPI-

PFK1 (EC 2.7.1.90) reversible para la interconversión de Fru6P a Fru1,6BP, tanto en condiciones glucolíticas como gluconeogénicas.

En la vía Embden-Meyerhof-Parnas, la ATP-PFK1 representa un punto importante de control del flujo glucolítico, debido a que la velocidad de esta enzima es modulada por efectores alostéricos y suelen tener varios sitios cooperativos. La familia PFK1A comprende a todas las proteínas cuya velocidad depende del ATP como donador del grupo fosforilo. Estas enzimas son comunes en organismos del Dominio *Bacteria* y *Eukarya* (Ashihara y Stupavska, 1984; Dandekar *et al.*, 1999; Ronimus y Morgan, 2003). Sin embargo, en *Archaea* la fosforilación de Fru6P puede ser catalizada por enzimas inusuales, las cuales pueden utilizar P_{Pi}, ADP o ATP como donador del grupo fosfato.

Las ATP-PFK1 de *Bacteria* son reguladas por PEP (inhibición) y ADP (activación). En cambio, las ATP-PFK1 provenientes de *Eukarya* son reguladas por un número mayor de efectores, tales como fructosa 2,6-bisfosfato (Fru2,6BP), citrato, Fru1,6BP, AMP, AMP cíclico (cAMP), Pi y 3-fosfoglicerato (Bräsen *et al.*, 20014). Además, estas enzimas son oligoméricas (dímeros o tetrámeros) y presentan cooperatividad. En las PFK1 descritas de *Archaea* no se ha reportado la existencia de cooperatividad.

La Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FruBPasa, E.C. 3.1.3.11) cataliza la conversión de la Fru1,6BP a Fru6P y fosfato inorgánico (Pi) en la gluconeogénesis y usualmente es un punto de control de esta vía. Hasta el momento, cinco tipos de esta enzima han sido reportados y están distribuidas en todos los organismos.

La versión clásica del gen que codifica para la FruBPasa I (presente en *E. coli* y humano) se encuentra en organismos del Dominio *Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea*, incluyendo *Halobacterium* NRC-1 (Siebers y Schönheit, 2005) y algunos metanogénicos,

como *Methanosarcina acetivorans* (Galagan *et al.*, 2001; Ronimus y Morgan, 2003; Bräsen *et al.*, 2014). La FruBPasa II y III son codificadas por otros genes que fueron descubiertos en *E. coli* (*glpX*) (Donahuea *et al.*, 2000) y *Bacillus subtilis* (*fbp*) (Fujita *et al.*, 1998). Sin embargo, a nivel de secuencia de nucleótidos, los genes *glpX* y *fbp* no comparten identidad significativa con los genes clásicos que codifican para las FruBPasas descritas. Además, algunos metanogénicos poseen genes ortólogos que podrían codificar para una FruBPase II (Sato *et al.*, 2004; Galagan *et al.*, 2001).

2.1.2. Función de la ADP-PFK1 y FruBPasa en el metabolismo de *Methanosarcina acetivorans*.

En *Methanosarcina acetivorans*, la conversión de Fru1,6BP a Fru6P es catalizada por la enzima Fructosa 1,6-Bisfosfatasa (FruBPasa Tipo I o Tipo II) y en el sentido contrario por la enzima Fosfofructocinasa dependiente de ADP (ADP-PFK1). En la célula, estas dos enzimas pueden catalizar solo un sentido de la reacción, por lo que se propone que son pasos importantes en la regulación concertada de estas vías metabólicas.

En el genoma de *M. acetivorans* se han reportado dos genes hipotéticos que podrían codificar para los dos tipos de FruBPasa (Galagan *et al.*, 2002). En el proyecto anterior, determinamos que el nivel de transcrito de *frubpasa I* fue mayor en células en fase exponencial de crecimiento celular (20 horas) *versus* células en fase estacionaria (60 horas); en cambio, el nivel de transcrito de *frubpasa II* tuvo una tendencia a disminuir en células de 60 versus 20 horas de cultivo, pero esta variación no fue estadísticamente significativa. Además, la actividad total de FruBPasa y el flujo gluconeogénico solo fue detectado en las fracciones citosólicas enriquecidas de células de 20 horas de cultivo. En el caso contrario, el contenido del transcrito de *adp-pfk1* disminuyó solo un 13% en células de 20 *versus* 60

horas de cultivo y la actividad de ADP-PFK1 y el flujo glucolítico fueron detectados exclusivamente en las fracciones citosólicas enriquecidas de células de 60 horas de cultivo).

Estos resultados sugirieron dos explicaciones posibles de la presencia/ausencia de la enzima activa de FruBPasa y ADP-PFK1 en los dos estados metabólicos: 1) que la expresión constante del gen sintetiza un mRNA que traduce una proteína inactiva y su actividad es regulada por una modificación post-traducciona (fosforilación y desfosforilación) y por una regulación metabólica, o bien 2) que la enzima se degrada.

Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es la evaluación de los mecanismos de regulación: 1) transcripcional, 2) post-traducciona y 3) metabólica de la FruBPasa II y ADP-PFK1 de *Methanosarcina acetivorans* y su papel en la regulación de las vías de síntesis y degradación de carbohidratos.

Los resultados de esta segunda parte del proyecto se muestran en el siguiente artículo, el cual se encuentra en preparación.

2.2. RESULTADOS

Artículo de investigación: Regulatory role of ADP-PFK1 and FruBPase II on the gluconeogenesis/glycolysis fluxes in *Methanosarcina acetivorans* (en preparación)

Michel Geovanni Santiago-Martínez, Juan Carlos Gallardo-Pérez, Rusely Encalada, Elizabeth Lira-Silva, Juan Pablo Pardo, Rafael Moreno-Sánchez and Ricardo Jasso-Chávez.

**Regulatory role of ADP-PFK1 and FruBPase II on the gluconeogenesis/glycolysis
fluxes in *Methanosarcina acetivorans***

Michel Geovanni Santiago-Martínez^{1*}, Juan Carlos Gallardo-Pérez¹, Rusely Encalada¹,
Elizabeth Lira-Silva¹, Juan Pablo Pardo², Rafael Moreno-Sánchez¹ and Ricardo Jasso-
Chávez^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ciudad de México, México.

²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad de México, México.

Running Title: ADP-PFK1 and FruBPase II activities are regulated by phosphorylation.

*Authors for correspondence:

Michel Geovanni Santiago-Martínez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología.

Juan Badiano # 1, Sección XVI, Tlalpan, México D.F. 14080. México.

Fax (52) 55-5573-0994. E-mail: geo.sm89@gmail.com

Ricardo Jasso-Chávez, Ph. D.

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología.

Juan Badiano # 1, Sección XVI, Tlalpan, México D.F. 14080. México.

Fax (52) 55-5573-0994. E-mail: rjassoeh@gmail.com

ABSTRACT

Methane-producing microorganisms or methanogens are a diverse and interesting group due to their evolutionary and ecological importance as well as for their potential applications in biotechnological processes. However, the knowledge of the carbohydrate metabolism and its regulation in these organisms is still scarce. The understanding of the different levels of carbohydrate metabolism regulation in methanogens is essential because these organisms can grow only on acetate or methylated compounds, for example, amines, sulfides or methanol. Methanogens use the Embden-Meyerhoff-Parnas gluconeogenic pathway and some of them synthesize glycogen. In absence of an external carbon source, glycogen-forming methanogens can use glycogen degradation by glycolytic pathway for the ATP maintenance. The dephosphorylation of Fru1,6BP requires a Fructose-1,6-bisphosphatase (FruBPase) whereas the phosphorylation reaction of fructose-6P to fructose-1,6-bisphosphate is catalyzed by different isoforms of Phosphofructokinase 1 (PFK1). So far, PFK1 and FruBPase from *Archaea* have been reported to show hyperbolic kinetics suggesting the absence of cooperative sites, unlike most bacterial and eukaryal counterparts. The regulation at different levels of PFK1/FruBPase and glycolysis/gluconeogenesis would enable to understand the methanogen central metabolism with the aim to direct some future strategies of Metabolic Pathway Engineering and Protein Directed Evolution. In this work, we characterize the kinetic and the regulatory properties of recombinant ADP-PFK1 and FruBPase of *Methanosarcina acetivorans*. Also, we analyzed the total protein content using specific antibodies and their relation with functional protein, post-translational modifications (phosphorylation/dephosphorylation) and activity modulation by metabolites of these unusual enzymes.

Keywords: Metabolic regulation, enzyme kinetics, phosphorylation, post-translational modifications, methanogenesis.

Abbreviations

ADP, adenosine-5'-diphosphate; ALDO, fructose 1,6 biphosphatealdolase; AMP, adenosine-5'-monophosphate; ATP, Adenosine-5'-triphosphate; EGTA, ethylene glycol tetra acetic acid; Fru1,6BP, fructose-1,6-bisphosphate; FruBPase, fructose-1,6-bisphosphatase; Fru6P, fructose-6-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GDP, guanosine-5'-diphosphate; Glc1P, glucose-1-phosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; Glc6P, glucose-6-phosphate; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; α GPDH, α -glycerophosphate dehydrogenase; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid; HK, hexokinase; PEP, phosphoenolpyruvate; PFK1, phosphofructokinase 1; TPI, triosephosphateisomerase; UDP, uridine-5'-diphosphate.

1. Introduction

In the glycogen-forming mesophilic and (hyper)-thermophilic *Archaea*, the efficient carbon assimilation by gluconeogenesis and glycolysis (glycogen degradation) is not only necessary for providing precursors for the synthesis of macromolecules and polysaccharide storage, but also could be involved in the ability of these microorganisms to resist different types of stressors, such as nutrient starvation for the ATP supply (Borges *et al.*, 2006; Santiago-Martínez *et al.*, 2016) and biofilm synthesis against the presence of heavy metals (Koerdt *et al.*, 2010; Lira-Silva *et al.*, 2013), oxygen (Jasso-Chávez *et al.*, 2015) and high osmolarity (Srivastava and Kowshik, 2013).

Fructose-1,6-bisphosphatase (FruBPase, E.C. 3.1.3.11) catalyzes the conversion of Fru1,6BP to Fru6P and inorganic phosphate (Pi) in the gluconeogenic pathway, usually a bypass reaction of glycolysis. Five types of this enzyme have been reported so far and are distributed in all organisms (Ronimus and Morgan, 2003; Bräsen *et al.*, 2014). FruBPase

activity (using Fru1,6BP as substrate) has been demonstrated in cytosolic-enriched fractions of *Pyrococcus furiosus* and *Methanothermobacter thermoautotrophicum* grown under gluconeogenic conditions, but orthologous genes of FruBPases had not been identified on *Archaea* genomes previously (Schafer and Schönheit, 1993; Fuchs *et al.*, 1983). In the *M. acetivorans* genome two putative genes encoding for FruBPase I and FruBPase II (MA3344 and MA1152, respectively; UniProt Protein Database Code: Q8TKQ4 and Q8TRM3) have been identified (Galagan *et al.*, 2001). FruBPase activity (using Fru1,6BP as substrate) has been determined exclusively in cells under glycogen synthesis condition (gluconeogenic flux). However, there is no evidence for two gene products or two active proteins. In *M. acetivorans*, significant lower transcript content was determined for FruBPase I ($50 \pm 23\%$) in cells growing under glycogen degradation (glycolytic flux) *versus* glycogen synthesis (gluconeogenic flux) conditions. No significant changes were determined for FruBPase II ($76 \pm 20\%$) under the same conditions (Santiago-Martínez *et al.*, 2016).

In the classical Embden-Meyerhof-Parnas pathway of *Bacteria* and *Eukarya*, the phosphorylation of Fru6P to Fru1,6BP is catalyzed by ATP-dependent phosphofructokinase 1 (ATP-PFK1). This step represents a key control point of glycolysis flux due to the classical ATP-PFK 1 activity which is strongly regulated by allosteric effectors. Instead, anaerobic *Euryarchaeota* and glycogen-forming methanogens can use some unusual enzymes as ADP-dependent PFK1 (Verhees *et al.*, 2001). A *pfkC* gene (MA3563, UniProt Protein Database Code: P58847) encoding a putative ADP-PFK1 has been identified in the genome of the marine methanogen *Methanosarcina acetivorans* (Galagan *et al.*, 2001). Indeed, the ADP-dependent PFK1 activity has been determined in cytosol-enriched fractions of *M. acetivorans* exclusively under glycogen degradation condition (glycolytic

flux), but neither ATP-PFK1, PPi-PFK1, ADP-Hexokinase (ADP-HK), nor ATP-Hexokinase (ADP-HK) activities were detected. Also, the transcript content of ADP-PFK1 (MA3563) slightly decreased (13%) at cells grown under gluconeogenic condition *versus* glycolytic condition (Santiago-Martínez *et al.*, 2016). These data suggested that the transcript content may not be translated into protein or, if translated, the enzyme may be inactive (regulation by post-translational modifications) or its activity could be metabolically inhibited.

In this work, kinetic characterization, the metabolic regulation, protein contents and phosphorylation/dephosphorylation of ADP-PFK1 and FruBPase II are analyzed and discussed. The knowledge of the central metabolism and its regulation in methanogens may be important for future applications in biotechnological processes, for fast methane production, and may help to explain how methanogens contend against nutritional stress in their ecological niches.

2. Experimental procedures

2.1. Chemicals

G6PDH, HPI, ALDO, α GPDH, α GPDH/TPI, Glc6P, Fru6P and PEP were purchased from Roche (Mannheim, Germany). Phosphatase alkaline of shrimp, Glc6P, Glc1P, Fru6P, Fru1,6BP, PEP, Pyr, ATP, ADP, AMP, PPi, Pi, DTT, NADH, NAD⁺, NADP⁺, alanine and citrate were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). HEPES was from Research Organics (Cleveland, Ohio, USA). Absolute methanol was of analytical grade.

2.2. Growth conditions of *Methanosarcina acetivorans* and harvesting

M. acetivorans C2A was cultured under anoxic conditions in high salt medium (Sowers *et al.*, 1993) supplied with 240 mM methanol as a carbon source. Cultures were started by

adding 2 mg of cell inocula to fresh medium for further incubation at 37 °C without shaking. Growth determination and harvesting conditions were carried out as indicated by Santiago-Martínez *et al.*, (2016). For biochemical characterization (enzyme activities and metabolite contents), cultures of 50 mL were harvested after different times of cultivation under aerobic conditions, cell bottoms were washed once with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl₂ and 1 mM EGTA (TME buffer).

2.3. Gene amplification

Genomic DNA was purified from methanol-grown *M. acetivorans* strain C2 cells according to Jasso-Chávez *et al.*, (2017). Genes *pfk* (MA3563) and *fbpaseII* (MA1152) were amplified by PCR using *M. acetivorans* genomic DNA as the template and oligonucleotides, based on the codons of the five amino acids from the 5' and 3' ends of each gene. The sequence of the oligonucleotide primers used for each gene was:

pfk1(MA3563):

Forward: 5'-GAATTCGTGGACATAGAAGAA-3'

Reverse: 5'-GAGCTCTTATTTCCCTGAATGTTTCTG-3';

fbpaseII (MA1152):

Forward: 5'-GAATTCATGCCTCATCCAAAGACC-3';

Reverse: 5'-GAGCTCTTACAGGTAGAGTGGAGT-3'.

The primers contained restriction sites for EcoRI (5' end) and SacI (3' end) for cloning the genes into an expression vector. The PCR essays (50 µL) contained 1x *Pfu* DNA polymerase buffer with 2 mM MgSO₄ (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.5 mM deoxyribonucleotide phosphates mix (Fermentas), 15 pmol (0.6 µM) each of the forward and reverse primers specific for each gene were added. Two µg of genomic

DNA and 1.0 IU *Pfu* DNA polymerase (Fermentas) were used. The PCR conditions were 95° C for 2 min; 40 cycles of 0.5 min denaturation at 95°C, 0.5 min annealing at 60 or 55° C (*pfk* or *fbpaseII*, respectively) and 1.5 min of extension at 72 °C; followed by a final incubation at 72°C for 10 min. The PCR products (Blunt-end) were cloned into the pJET 1.2 vector (Fermentas; Waltham, MA, USA). Then, the PCR products were cloned into the EcoRI and SacI restriction sites of the pET28 plasmid (Novagen; Darmstadt, Germany) using a T4 DNA ligase (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and incubation at 16 °C without shaking overnight. The resulting plasmids were sequenced and used to transform *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells in order to over-express the protein fused to the His tag at N-terminus. No sequence alterations were found in the amplified genes compared to the annotated sequences for *pfk* and *fbpaseII* from the genomic database (UniProt Protein Database Code: MA3563=P58847 and MA1152= Q8TRM3, respectively).

2.4. Over-expression and protein purification of recombinant ADP-PFK1 and FruBPase II homolog from *M. acetivorans*

For ADP-PFK1 and FruBPase II over-expression, 1 L of Luria-Bertani medium was inoculated with the transformed bacteria. Cultures were grown at 37 °C up to an OD_{600 nm} of 0.600. Gene expression and protein synthesis were induced by adding 0.4 mM of isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) and then transferred to 16°C for overnight culture with agitation (200 rpm). The purification procedure was performed by Co²⁺ affinity chromatography as described before (Saavedra *et al.*, 2005) using the Talon metal-affinity resin (Clontech, Palo Alto, CA, USA). The recombinant enzymes were stored in 50% glycerol (v/v) at -20 °C and stability of activity was monitored for at least 8 weeks. Protein

determination was carried out according to Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) using samples of purified enzymes precipitated by 10% (v / v) trichloroacetic acid in order to eliminate interference by imidazole buffer. The purity of recombinant protein was determined by densitometric analysis on 12.5% (w / v) SDS /PAGE gels of protein samples (10 µg each one) stained with Coomassie blue (Saavedra *et al.*, 2005).

2.5. Kinetic characterization of the recombinant enzymes

Kinetic experiments were performed in the forward and reverse reactions at 37° C by following the NAD(P)⁺ reduction or NAD(P)H oxidation at 340 nm in a spectrophotometer Agilent (Santa Clara, CA, USA) as previously described elsewhere (Santiago-Martínez *et al.*, 2016). The reaction buffer contained 50 mM HEPES, 130 mM KCl, 1 mM EGTA and 50 mM NaCl at pH 7.0 (HKE-Na buffer). Controls were used to ensure that the reaction rate was a linear function of the enzyme concentration. It was always ensured that coupling enzymes were not limiting, which was tested by adding saturating concentrations of the product that was being monitored (and which was substrate of the coupling enzyme). The stock solutions of all substrates and modulators were always calibrated immediately before use.

Additionally, cytosol-enriched fractions of cells harvested at 12, 20, 40, 50 and 60 hours -culture were obtained for to determine FruBPase and ADP-PFK1 activities in initial velocity conditions.

The detailed standard kinetic assays of ADP-PFK1 (forward), FruBPase and GAPDH (forward) using recombinant enzymes or cytosolic-enriched fractions are described in (Santiago-Martínez *et al.*, 2016). For the ADP-PFK1 (reverse) 5 mM MgCl₂, 1 mM Fru1,6BP, 1 mM NADP⁺, 2–4 IU G6PDH (Roche), 2-4 HPI (Roche), 10-20 µg of

recombinant enzyme or 0.2-0.3 mg of cytosol-enriched fractions were used. The reaction was started by adding 3 mM AMP.

All enzymatic activities were reported as U/mg protein (U = 1 μ mole product produced *per* minute). Kinetic parameters V_{max} , K_m , K_i , and αK_i values were calculated by non-linear regression analysis of the experimental points fitted to the Henri-Michaelis–Menten equation using the Origin 5.0 software. Rapid equilibrium rate equation for a simple mixed-type inhibition was used in Origin 5.0 software for adjusting the experimental points:

$$v = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} * [S]}{K_s \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} * [S]}$$

Where: v = velocity, V_{max} = Maximal velocity, [I] = variable concentration of inhibitor, α = alpha value (the factor that modifies K_s value when the inhibitor occupies the enzyme), K_i = Affinity constant of inhibitor, [S] = variable concentration of substrate, K_s = Affinity constant of substrate.

2.6. Antibodies and Western Blotting

Antibodies were obtained from the yolks of hens that were previously immunized with 0.2 mL of *Ma*-PFK1 and *Ma*-FruBPasa II *plus* complete Freund adjuvant (0.5 mg protein/mL). Hens were injected subcutaneous below the wings three times with one week intervals of each injection. Antibodies were isolated by the use of polyethylene glycol (PEG) as

described by Polson *et al.*, (1980) and Pauly *et al.*, (2011), but using a triple precipitation of antibodies with PEG-8000 12% (w/v) and the dialysis with 3 L of Phosphate Buffered Saline pH 7.5 overnight at 4°C. SDS-PAGE of purified of *Ma*-PFK1 and *Ma*-FruBPasa II antibodies is shown in Figure S3 (*see* Supplementary information).

Cytosol-enriched fraction of cells harvested at 12, 20, 40, 50 and 60 hours -culture were electrophoresed by 12 % SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (BioRad, Hercules, CA, USA) (Gallardo-Pérez *et al.*, 2014). Electrophoretic transfer was followed by overnight immunoblotting with dilutions of *Ma*-PFK1 (1:2,000), *Ma*-FruBPasa II (1:2,000) and human GAPDH (1:200) primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, USA) at 4°C. The hybridization bands were revealed with the corresponding secondary antibodies (dilution 1:5,000) conjugated with horseradish peroxidase (Santa Cruz). The signal was detected by chemi-luminescence using the ECL-Plus detection system (Amersham Bioscience, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Densitometry analysis was performed using the Scion Image Software (Scion, Bethesda MD, USA) and normalized against its respective load control. Percentage of each isoform represents the mean \pm standard deviation of four independent experiments.

2.7. Dephosphorylation assays

Cytosol-enriched fractions of cells harvested at 20 or 60 h of culture (exponential and stationary phase of growth, respectively) were obtained for dephosphorylation assays. Both, the cytosol-enriched fractions and the recombinant enzymes were incubated with 1 U of Alkaline Phosphatase protein *plus* 10 mM MgCl₂, 0.01% Triton X-100 at pH 7.0 and 37° C during different times (hours). The residual activity was determined under initial velocity conditions.

2.8. Miscellaneous Procedures

For protein determination of cytosol-enriched fractions, the Biuret method was used (Lira-Silva *et al.*, 2013). Intracellular contents of Fru6P, Fru1,6BP, ATP, ADP, AMP, PPi and citrate were determined by following the NAD(P)⁺ reduction or NAD(P)H oxidation at 340 nm in a spectrophotometer Agilent (Santa Clara, CA, USA) by previously described methodologies (Marín-Hernández *et al.*, 2011; Santiago-Martínez *et al.*, 2016). Pi content was determined with colorimetric assay as described previously (Lira-Silva *et al.*, 2013).

3. Results

3.1. Biochemical and kinetic characterization of *Ma*-FruBPase II and *Ma*-ADP-PFK1

Ma-FruBPase II (92 % of purity in agreement with the densitometry analysis carried out in the Coomassie blue-stained gel, *see* Figure S1 in Supplementary information) showed a hyperbolic kinetics when varying Fru6BP (Figure 1A) with a *K_m* and *V_{max}* values of 0.1 ± 0.04 mM and 0.23 ± 0.06 U/mg protein, respectively (Table 1). Glc6P, Glc1P, Fru6P and PEP were not suitable as substrates. The enzyme requires Mg²⁺. The physiological concentration of Fru1,6BP in *M. acetivorans* suggested that the FruBPase may work near saturation within the cell. In the reverse reaction (Fru1,6BP synthesis), the *Ma*-FruBPase II activity was not detected.

Ma-ADP-PFK1 (95% of purity in agreement with the densitometry analysis carried out in the Coomassie blue-stained gel, *see* Figure S1 in Supplementary information) showed a hyperbolic kinetics when varying both Fru6P and ADP as substrates (Figure 2A and 2B). In forward sense of the reaction, *V_{max}* value of 7.1 ± 0.6 U/mg protein was determined with *K_m* values of 0.1 ± 0.03 mM and 0.26 ± 0.06 of Fru6P and ADP, respectively (Table 1). The activity required Mg²⁺ presence. ADP (100% of activity) could partly be replaced by 5

mM GDP (<10 %) or 5 mM UDP (<10%) but no PFK1 activity was detected with other Pi donors such as 1-5 mM ATP, 0.5-5 mM PPI, 0.5-5 mM acetyl-phosphate or 0.25 mg/mL polyphosphate. Also, *Ma*-ADP-PFK1 did not show the ability to catalyze the phosphorylation of sugars as Glucose, Glc6P or Glc1P or other substrates as PYR or PEP. In the reverse sense of the reaction, the activity reached was 0.42 ± 0.1 U/mg protein with *K_m* values of 0.11 ± 0.02 mM and 0.19 ± 0.03 mM for Fru1,6BP and AMP, respectively (Table 1) and the reverse reaction followed a hyperbolic kinetics when varying Fru1,6BP or AMP (See Figure S2 in Supplementary information). *Ma*-ADP-PFK1 was essentially activated by 120 mM K⁺, 50 mM Na⁺ and 7 mM NH₄⁺. Also, activation was additive (data not shown) as reported previously (Santiago-Martínez *et al.*, 2016).

3.2. FruBPase II and ADP-PFK1 contents and functional proteins

FruBPase activity and the amount protein were detected in cells of 12, 20 and 40 hours of growth (Figure 3A-C). Also, the Western Blot analysis indicated a tendency of decrease for FruBPase after 50 hours of cultivation and no FruBPase activity was detected in cells of 50 and 60 hours of growth, when an external carbon source is absent (Santiago-Martínez *et al.*, 2016). In contrast, ADP-PFK1 activity and the amount protein were present after 40 hours of cultivation, with a tendency to increase at 60 hours, when glycogen degradation started (Santiago- Martínez *et al.*, 2016) (Figure 3A-C). At 40 hours, the amount of FruBPase is similar to 12 and 20 hours but the activity is low. Instead, the content of ADP-PFK1 is very low but the activity is only 50% lower than 50 and 60 hours. Therefore, if there is no direct relationship between the content of the total protein and the amount of active, then other mechanisms that regulate their activity must be active.

3.3. Metabolic regulation of ADP-PFK1 and FruBPase activities

Ma-FruBPase II was inhibited by AMP ($K_i = 9 \pm 1 \mu\text{M}$, $\alpha=1.9$, Figure 1B), ADP ($\text{IC}_{90} = 4.6 \pm 1 \text{ mM}$) and ATP ($\text{IC}_{90} = 5 \pm 1 \text{ mM}$), but the citrate was an activator ($K_{0.5} = 0.3 \text{ mM}$) (Table 1). The addition of 1-50 mM glucose, 0.5-5 mM PEP, 0.5-5 mM PYR to the assay mixture had no effect on FruBPase activity (data not shown).

ATP and AMP showed a mixed-type inhibition on *Ma*-ADP-PFK1 activity when varying both Fru6P and ADP as substrates (Figure 2C-2D). K_i and α values are shown in Table 1. Also, Pi y P_i inhibited *Ma*-ADP-PFK1 activity with IC_{50} values of 12-16 mM and >10 mM, respectively (Table 1). In contrast, no significant inhibitory effect by 0.1-3 mM citrate, 0.5-5 mM PEP, 1-5 mM acetyl-phosphate or 50 $\mu\text{g/mL}$ polyphosphate on ADP-PFK1 activity was attained.

3.4. Post-translational regulation of ADP-PFK1 and FruBPase

In the cytosol-enriched fractions of *M. acetivorans* obtained from cells of 60 hours of growth, the ADP-PFK1 activity decreased to 50% when these fractions were incubated with commercial alkaline phosphatase protein, suggesting that the active form of ADP-PFK1 is a phosphorylated enzyme. No significant inhibitory effect was determined on GAPDH activity of cytosol-enriched fractions from cells grown 20 or 60 hours. Both, ADP-PFK1 activity and incubation effect were not detected in the cytosol-enriched fractions of *M. acetivorans* on cells of 20 hours of growth (Figure 4).

In presence of physiological concentrations of AMP and ATP (4 and 5 mM, respectively), the activity of ADP-PFK1 dephosphorylated was <3% compared with the

phosphorylated enzyme form. There is a concerted regulation at metabolic (fast response) and post-translational (half time term response) level.

The effect of this incubation on FruBPase activity could not be determined with standard kinetic assays because the commercial alkaline phosphatase protein had the ability of Fru1,6BP dephosphorylation.

4. Discussion

To understand how the metabolic fluxes and the overall cellular processes are modulated, it is necessary to know their regulatory complexity at different levels.

The fastest short-term metabolic regulation is the activity modulation of an enzyme or transporter by the concentration of their substrates or products (Cohn & Yandrasitz, 1980). Within the cell, the availability of substrates or products has an effect on enzymes kinetic parameters V_{max} , K_m and V_{max}/K_m values. Therefore, the intracellular concentrations of substrates or products can modulate these kinetic parameters of enzymes or transporters and adjust their *in vivo* activity to exert a significant effect on a metabolic pathway or cellular process (Moreno-Sánchez *et al.*, 2016; Gerosa & Sauer, 2011).

In *M. acetivorans*, the physiological concentration of Fru6P and ADP were found to be saturating for the ADP-PFK1 within the cell; however, ATP and AMP could attenuate its activity due to their strong inhibition of the enzyme. Also, FruBPase activity is strongly inhibited by AMP but the intracellular concentrations of citrate (2 mM at 20 h and 0.5 mM at 60 h of culture) could decrease the inhibitory effect of the AMP and hence modulate the gluconeogenic flux. In general terms, the intracellular concentrations of these metabolites are higher than K_i or IC_{50} values and modulate the metabolic the flux.

Hyperbolic kinetics of ADP-PFK1 and FruBPase II suggested the absence of cooperative sites, unlike most bacterial and eukaryal counterparts. It is possible that both enzymes are functional as monomers. The oligomerization state of the ADP-PFK1 enzymes can be variable, but all are composed of subunits of approximately 50- kDa. In *T. zilligii* and *P. furiosus* functional proteins were characterized as homotetrameric, but ADP-HK/PFK1 of *M. jannaschii* and *M. maripaludis* are monomers. The *A. fulgidus* enzyme is active as both a dimer and a tetramer (Hansen and Schönheit, 2004).

Genome sequence analyses have unveiled that in most *Archaea*, the orthologous genes of FruBPase I-III are absent and their identification on the nucleotide or aminoacid sequence level could not be achieved, despite the presence of the other genes involved in gluconeogenesis (Sato *et al.*, 2004). Probably, such differences in non-catalytic domains and their lack of sequence identity with other genes limit their identification in genome sequence analyses.

The activity of FruBPase is highly regulated through various mechanisms in order to avoid the futile cycle, which occurs by the simultaneous functioning of both FruBPase and PPi-, ADP- or ATP-PFK1. Functional enzyme can be also regulated by post-translational modifications and protein degradation. Generally, the Post-translational modifications (PTM) play a major role in cellular process regulation, since they allow for a fast response to environmental changes (Cohn & Yandrasitz, 1980). The most important PTM is probably reversible protein phosphorylation, which has a crucial role in signal transduction and PTMs found in *Bacteria* and *Eukarya* can also be found in *Archaea* (Esser *et al.*, 2016), but its role should be evaluated experimentally.

However, phosphorylation or other post-translational modifications on different types of PFK1 and FruBPase have yet not to be demonstrated. Using *KinasePhos* software

(Huang *et al.*, 2005), potential sites of phosphorylation on aminoacid sequence of ADP-PFK1 and FruBPase II of *M. acetivorans* were found in tyrosine, serine and threonine residues. In this work, the *in vitro* evaluation and experimental validation were shown and suggest its important role on metabolic fluxes regulation. Others predictions of PTMs were not found, but the possibility of its existence are not ruled out.

Future omics studies combined with biochemical characterization of enzymes will provide further new insights and will extend our current understanding of central metabolism and its regulation in *Archaea*. Phosphoproteome and the evaluation of the different regulation mechanisms are necessary to identify and study more metabolic pathways in methanogens or other *Archaea* with ecological and biotechnological importance. This study may help to optimize and increase the metabolite production with biotechnological and biomedical importance.

5. Conclusions

In addition to gene expression, phosphorylation and dephosphorylation of ADP-PFK1 could provide medium-term regulation of glycolytic flux. Also, metabolic regulation of ADP-PFK1 and FruBPase could provide a fast and transitory modulation of the glycolytic and gluconeogenic fluxes.

These results suggest a very complex regulation of metabolic fluxes at different levels in order to maintain the cellular homeostasis. Perhaps it is possible that this complexity allows *Archaea* microorganisms to survive in extreme environments and to resist different types of stressor and this information could be used to direct future strategies of Metabolic Pathway Engineering, where the production of biomass and energy balance is a parameter that limits biotechnological processes.

Acknowledgements

This research was partially supported by grants Nos. 156969 (RJC), 239930 (RMS) and 243249 (JCGP) from CONACyT-Mexico. And also by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Ph.D. fellowship to MGSM (280295) from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Author contributions

RJC, MGSM and RMS planned the experiments. MGSM, ELS, RE, JCGP and performed the experiments. RJC, MGSM, JPP and RMS analyzed the data. MGSM, RJC and RMS wrote the paper.

References

- Borges N, Gonçalves LG, Rodrigues MV, Siopa F, Ventura R, Maycock C, Lamosa P, Santos H. 2006. Biosynthetic pathways of inositol and glycerol phosphodiesterases used by the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* in stress adaptation. *J. Bacteriol.* 188 (23): 8128-8135.
- Bräsen C, Esser D, Rauch B, Siebers B. 2014. Carbohydrate metabolism in archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78 (1): 89-175.
- Castro-Fernandez V, Bravo-Moraga F, Herrera-Morande A, Guixé V. 2014. Bifunctional ADP-dependent phosphofructokinase/glucokinase activity in the order *Methanococcales*-biochemical characterization of the mesophilic enzyme from *Methanococcus maripaludis*. *FEBS J.* 281 (8): 2017-2029.
- Esser D, Hoffmann L, Pham TK, Bräsen C, Qiu W, Wright PC, Albers SV, Siebers B. 2016. Protein phosphorylation and its role in archaeal signal transduction. *FEMS Microbiol. Rev.* 40 (5): 625-647.
- Fuchs G, Winter H, Steiner I, Stupperich E. 1983. Enzymes of gluconeogenesis in the autotroph *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* 136 (2): 160-162.

- Galagan JE, Nusbaum C, Roy A, Endrizzi MG, Macdonald P, Fitz Hugh W, Calvo S, Engels R, Smirnov S, Atnoor D, *et al.* 2002. The genome of *Methanosarcina acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genom. Res.* 2 (1): 532–542.
- Gallardo-Pérez JC, Rivero-Segura NA, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. 2014. GPI/AMF inhibition blocks the development of the metastatic phenotype of mature multi-cellular tumor spheroids. *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Research.* 1843 (6): 1043-1053.
- Gerosa L, Sauer U. 2011. Regulation and control of metabolic fluxes in microbes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (4): 566-575.
- Hansen T, Schönheit P. 2004. ADP-dependent 6-phosphofructokinase, an extremely thermophilic, non-allosteric enzyme from the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324. *Extremophiles.* 8 (1): 29–35.
- Huang HD, Lee TY, Tzeng SW, Horng JT. 2005. *KinasePhos*: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res.* 33 (Web Server issue):W226-229.
- Jasso-Chávez R, Santiago-Martínez MG, Lira-Silva E, Pineda E, Zepeda-Rodríguez A, Belmont-Díaz J, Encalada R, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. 2015. Air-adapted *Methanosarcina acetivorans* shows high methane production and develops resistance against oxygen stress. *PLoS One.* 10 (2): e0117331.
- Jasso-Chávez R, Diaz-Perez C, Rodríguez-Zavala JS, Ferry JG. 2017. Functional Role of MrpA in the MrpABCDEF Na⁺/H⁺ antiporter Complex from the archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *J. Bacteriol.* 199 (2): e00662-16.
- Kletzin A. 2007. General characteristics and important model organisms. Chapter 2.p 14-92. In Cavicchioli R (ed), *Archaea*. ASM Press, Washington, DC.
- Koerdt A, Gödeke J, Berger J, Thormann KM, Albers SV. 2010. *Crenarchaeal* biofilm formation under extreme conditions. *PLoS ONE.* 5 (11): e14104.
- Lira-Silva E, Santiago-Martínez MG, García-Contreras R, Zepeda-Rodríguez A, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Jasso-Chávez R. 2013. Cd²⁺ resistance mechanisms in *Methanosarcina*

- acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis. *Environ. Microbiol. Rep.* 5 (6): 799–808.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1): 265–275.
 - Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Rumjanek FD, Rodríguez-Enríquez S. 2016. Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitations of current omics analyses. *FEBS J.* 283 (1): 54-73.
 - Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. 2011. IgY Technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (51), 3084. Advance online publication. <http://doi.org/10.3791/3084>
 - Polson A, von Wechmar MB, van Regenmortel MH. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.* 9 (1): 475–493.
 - Reichlen MJ, Vepachedu VR, Murakami KS, and Ferry JG. 2012. MreA functions in the global regulation of methanogenic pathways in *Methanosarcina acetivorans*. *mBio*3 (4): e00189-12.
 - Rittmann D, Schaffer S, Wendisch VF, Sahn H. 2003. Fructose-1,6-bisphosphatase from *Corynebacterium glutamicum*: expression and deletion of the *fbp* gene and biochemical characterization of the enzyme. *Arch. Microbiol.* 180 (4): 285–292.
 - Ronimus RS, Morgan HW. 2003. Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hyperthermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. *Archaea.* 1 (3): 199–221.
 - Saavedra E, Encalada R, Pineda E, Jasso-Chávez R, Moreno-Sánchez R. 2005. Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS J.* 272 (7): 1767-1783.
 - Santiago-Martínez MG, Encalada R, Lira-Silva E, Pineda E, Gallardo-Pérez JC, Reyes-García MA, Saavedra E, Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A, Jasso-Chávez R. 2016. The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes. *FEBS J.* 283 (10):1979-1999.

- Schafer T, Schönheit P. 1993. Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Embden-Meyerhof pathway. *Arch. Microbiol.* 159 (4): 354–363.
- Sowers KR, Boone JE, Gunsalus RP. 1993. Disaggregation of *Methanosarcina* spp and growth as single cells at elevated osmolarity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1): 3832–3839.
- Srivastava P, Kowshik M. 2013. Mechanisms of metal resistance and homeostasis in *Haloarchaea*. *Archaea.* (1): 732864.
- Verhees CH, Tuininga JE, Kengen SW, Stams AJ, van der Oost J, deVos WM. 2001. ADP-dependent phosphofructokinases in mesophilic and thermophilic methanogenic archaea. *J. Bacteriol.* 183 (24): 7145–7153.

Table 1. Kinetic parameters of recombinant ADP-PFK1 and FruBPasa II of *Methanosarcina acetivorans*.

Enzyme	<i>k_{cat}</i> (s ⁻¹) [<i>V_{max}</i>] (U/mg prot)	<i>K_m</i> (mM)	<i>k_{cat}</i> / <i>K_m</i> (M ⁻¹ s ⁻¹)	Inhibitor (mM)
Ma-PFK1	Forward 6.4×10 ³ [7.1 ± 0.6] Reverse 0.4×10 ³ [0.42 ± 0.1]	Fru6P = 0.1 ± 0.03 ADP= 0.26 ± 0.06 Fru1,6BP= 0.11 ± 0.02 AMP= 0.19 ± 0.03	Forward 6.5 × 10 ⁴ Reverse 0.4×10 ⁴	$K_{i \text{ ATP versus Fru6P}} = 1.2 \pm 0.1$ Mixed type, $\alpha = 1.2 \pm 0.1$ $K_{i \text{ ATP versus ADP}} = 1.0$ (1) Mixed type, $\alpha = 4.9$ (1) $K_{i \text{ AMP versus Fru6P}} = 2.8 \pm 0.5$ Mixed type, $\alpha = 1.1 \pm 0.1$ $K_{i \text{ AMP versus ADP}} = 1.8 \pm 0.5$ Mixed type, $\alpha = 1.1 \pm 0.1$ $IC_{50 \text{ Pi-Mg}} = 12-16$ $IC_{50 \text{ PPi-Mg}} > 10$
Ma-FruBPasa II	Forward 0.4×10 ³ [0.23 ± 0.06] Reverse No detected	Fru1,6BP= 0.1 ± 0.04	Forward 1.5 × 10 ⁴	$K_{i \text{ AMP versus Fru1,6BP}} = 0.009 \pm 0.001$ Mixed type, $\alpha = 1.9$ $IC_{90 \text{ ADP}} = 4.6 \pm 1$ $IC_{90 \text{ ATP}} = 5 \pm 1$

Values are the mean ± SD of four independent enzyme preparations. For *k_{cat}* values were calculated using a theoretical molecular weight of a monomer of 55 kDa and 40 kDa for Ma-ADP-PFK1 and Ma-FruBPasa II, respectively.

FIGURES

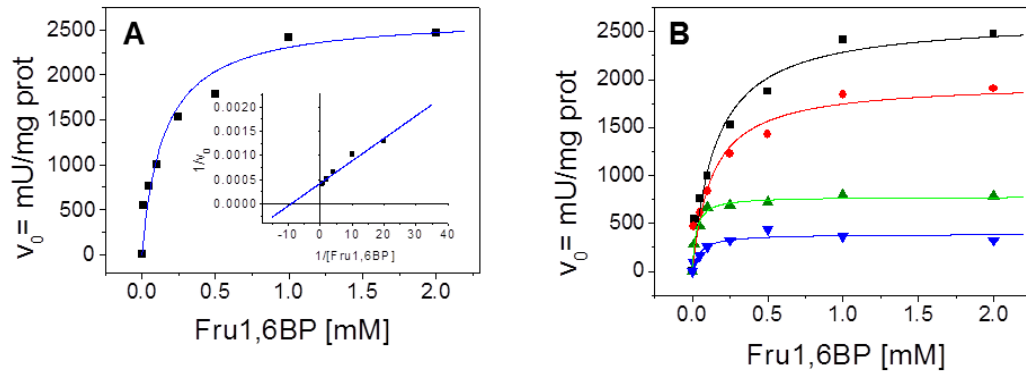


Figure 1. Modulation of the recombinant FruBPasa II activity in *M. acetivorans*. The *Ma*- FruBPasa II kinetics when varying Fru1,6BP was hyperbolic. Assays were all determined at pH 7 and 37°C with 1.2 mM Fru1,6BP. Values are the mean \pm SD of three independent experiments. Inset shows the double reciprocal ($1/v_0$ versus $1/[Substrate]$) Lineweaver-Burk plot further indicating that the enzyme kinetics is hyperbolic but not cooperative. (B) Nonlinear regression analysis of the AMP inhibition on *Ma*- FruBPasa II activity showed mixed-type simple inhibition. AMP concentrations (μM) were (■) 0, (●) 10, (▲) 20 and (▼) 40. Assays were all determined in initial velocity (v_0) conditions.

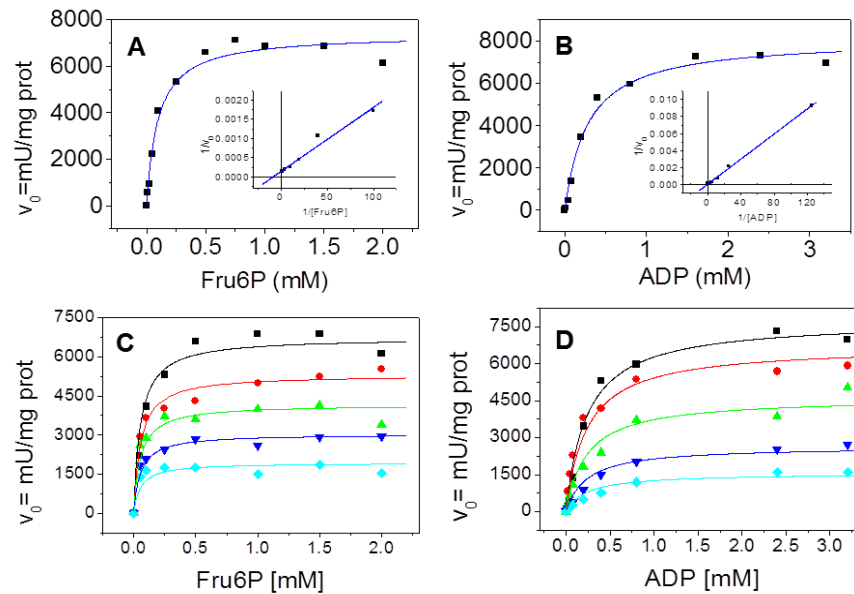


Figure 2. Modulation of the recombinant ADP-PFK1 activity in *M. acetivorans*. The *Ma*-ADP-PFK1 kinetics when varying Fru6P (A) or ADP (B) was hyperbolic. Assays were all determined at pH 7 and 37°C with 3 mM ADP and varied Fru6P in A and with 1.2 mM Fru6P and varied ADP in B. Values are the mean \pm SD of four independent experiments. Insets show the double reciprocal ($1/v_0$ versus $1/[\text{Substrate}]$) Lineweaver-Burk plot further indicating that the enzyme kinetics is hyperbolic but not cooperative. (C) Nonlinear regression analysis of the AMP inhibition on *Ma*-ADP-PFK1 activity showed mixed-type simple inhibition (see Experimental procedures). AMP concentrations (mM) were (■) 0, (●) 1, (▲) 2, (▼) 4 and (◆) 6. Assays were all determined in initial velocity (v_0) conditions.

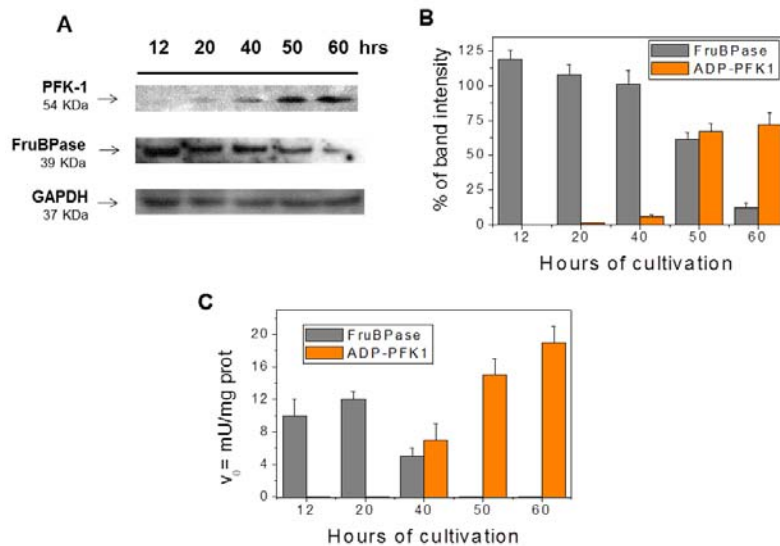


Figure 3. Protein contents and activity of ADP-PFK1 and FruBPase in *M. acetivorans*.

(A) Protein contents of ADP-PFK1 and FruBPase at the indicated hours of culture. For Western Blot assays the antibodies were obtained from chicken egg yolks (*see* Materials and methods section). (B) Densitometric analysis was carried out by normalizing the loading signal of the internal control GAPDH. Values are the mean \pm SD of three independent experiments. (C). Active protein contents of ADP-PFK1 and FruBPase. The activities were determined in cytosol-enriched fraction of cells grown at the indicated hours of culture. Assays were all determined in initial velocity (v_0) conditions. Values are the mean \pm SD of four independent experiments. mU= nmol/min.

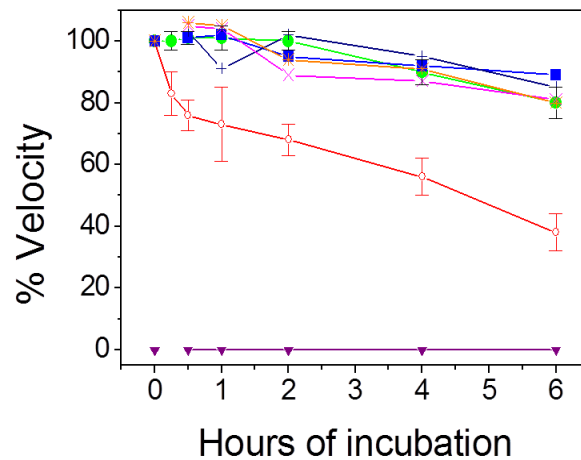


Figure 4. Effect of the incubation with Alkaline Phosphatase protein (PP) on ADP-PFK1 activity. Values of ADP-PFK1 are the mean \pm SD of three independent experiments. Values of NADP⁺-GAPDH at 20 or 60 hours are one experiment. The activities were determined in cytosol-enriched fraction of cells grown at the indicated hours of culture. (●) ADP-PFK1 at 60 h of growth without PP, (○) ADP-PFK1 at 60 h of growth with 0.5 U PP, (▼)ADP-PFK1 at 60 h of growth with 0.5 U PP, (■)NADP⁺-GAPDH at 60 h of growth without PP, (+) NADP⁺-GAPDH at 60 h of growth 0.5 U PP, (*)NADP⁺-GAPDH at 20 h of growth without PP and (×)NADP⁺-GAPDH at 60 h of growth with 0.5 U PP.

Supplementary information

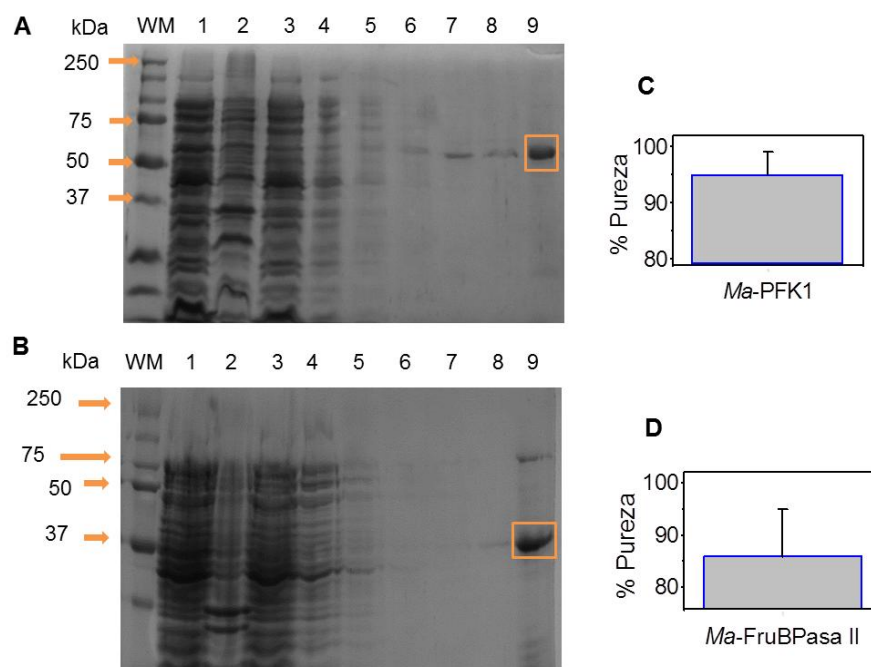


Figure S1. SDS-PAGE of fractions obtained during Ma-ADP-PFK1 and Ma-FruBPasa II purification. SDS -PAGE showing the recombinant purified *Methanosarcina acetivorans* ADP-PFK1 (A) and FruBPasa II (B). The enzyme molecular mass indicated corresponds to that of the His6-tailed protein. The percentage purity (C and D) was determined by densitometric analysis using the Scion Image Software (Scion, Bethesda MD, USA) and normalized against all bands presents in line 9. WM: weight marker (molecular weight standards); Lines: 1) Cytosol soluble fraction of total lysate; 2) Membrane fraction of total lysate; 3) Cytosol fraction without column affinity or not retained in the column; 4-6) Wash fractions with 2 mM Imidazole; 7) Wash with 10 mM Imidazole; 8= Elution with 100 mM Imidazole; 9) Recombinant purified protein (10 μ g).

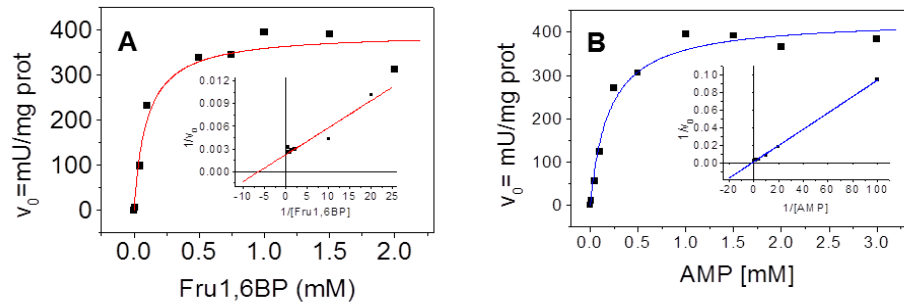


Figure S2. Reverse activity of the recombinant *Ma*-ADP-PFK1. The *Ma*-ADP-PFK1 kinetics when varying Fru1,6BP (A) or AMP (B) was hyperbolic. Assays were all determined at pH 7 and 37°C with 3.5 mM AMP and varied Fru6P in A and with 1.5 mM Fru1,6BP and varied AMP in B. Values are the mean \pm SD of four independent experiments. Insets show the double reciprocal ($1/v_0$ versus $1/[Substrate]$) Lineweaver-Burk plot further indicating that the enzyme kinetics is hyperbolic but not cooperative.

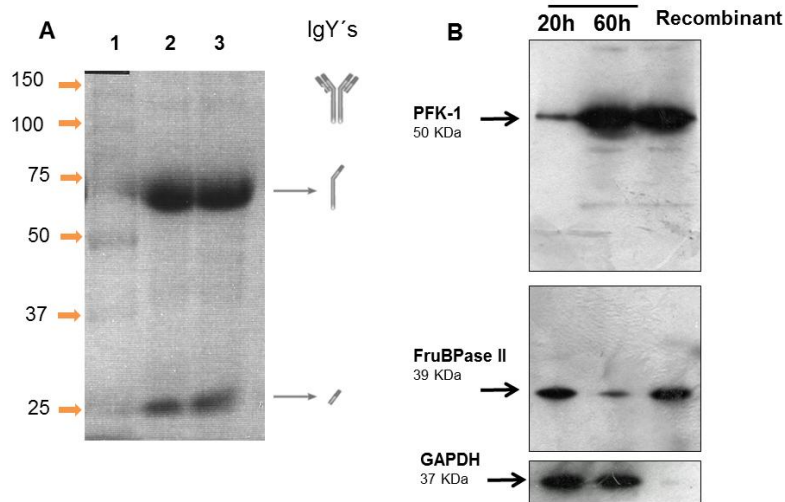


Figure S3. SDS-PAGE of the Anti-*Ma*-PFK1 and Anti-*Ma*-FruBPase II purification and Western Blot. (A). SDS-PAGE of purified antibodies 1) Molecular weight standards. 2) Anti-*Ma*-PFK1. 3) Anti-*Ma*-FruBPase II. (B) Western Blot assays using the antibodies obtained from chicken egg yolks (*see* Materials and methods section).

III. PERSPECTIVAS

Este análisis transcripcional, cinético y metabólico nos permitió contribuir en el entendimiento de los niveles diferentes de regulación del metabolismo de carbohidratos en arqueas, utilizando como ejemplo el estudio de dos proteínas claves en la glucólisis y la gluconeogénesis de *M. acetivorans*. En un futuro cercano se podría hacer un análisis similar en los pasos donde también se observaron cambios a nivel de contenido de mRNA y de enzima activa en los dos estados metabólicos, por ejemplo, en la Glucógeno sintasa/Glucógeno fosforilasa o PYK/PPDK (Santiago-Martínez *et al.*, 2016). Además, esta información podría ayudar a dirigir estrategias futuras en la Ingeniería de Vías Metabólicas con enfoques biotecnológicos, donde la asimilación y la redistribución del flujo del carbono podrían ser modificados para aumentar la biomasa celular y la velocidad de síntesis del gas metano. Este mismo enfoque podría ser utilizado para otras vías metabólicas, ya que otros grupos de trabajo han demostrado la expresión constitutiva de algunos genes involucrados en vías anabólicas de metanogénicos, cuya función (enzima activa) debería estar regulada con la finalidad de mantener la homeostasis celular (Peterson *et al.*, 2016).

Por último, la generación de células mutantes de *M. acetivorans* que no puedan sintetizar a las enzimas clave de estas vías metabólicas (ADP-PFK1, FruBPasa, GYS o GYP) podría proveer información acerca de su función en el mantenimiento de la homeostasis celular. Asimismo, permitirían conocer la susceptibilidad de estas células ante los diferentes tipos de estrés (nutricional, oxidativo, osmótico, exposición a metales pesados, entre otros).

IV. REFERENCIAS

- Abbanat, D. R., Ferry, J. G. (1990) Synthesis of acetyl coenzyme A by carbon monoxide dehydrogenase complex from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* 172 (12), 7145-7150.
- Ashihara, H., Stupavska, S. (1984) Comparison of activities and properties of pyrophosphate- and adenosine triphosphate-dependent phosphofructokinases of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *J. Plant Physiol.* 116 (3), 241-252.
- Bock, A. K., Kunow, J., Glasemacher, J., & Schönheit, P. (1996) Catalytic properties, molecular composition and sequence alignments of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* (strain Fusaro). *Eur. J. Biochem.* 237 (1), 35-44.
- Borges, N., Gonçalves, L.G., Rodrigues, M. V., Siopa, F., Ventura, R., Maycock, C., Lamosa, P., Santos, H. (2006) Biosynthetic pathways of inositol and glycerol phosphodiester used by the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* in stress adaptation. *J. Bacteriol.* 188 (23), 8128-8135.
- Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B., Siebers, B. (2014) Carbohydrate metabolism in archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78 (1), 89-175.
- Cohn, R. M., Yandrasitz, J. R. (1980) Modulation of enzyme activity. En: Herman, R.H. *et al.* Principles of Metabolic Control in Mammalian System. Plenum Press, New York. Cap. 4.
- Cooper, R. A., Kornberg, H. L. (1967) The direct synthesis of phosphoenolpyruvate from pyruvate by *Escherichia coli*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 168 (1012), 263-280.
- Dandekar, T., Schuster, S., Snel, B., Huynen, M., Bork, P. (1999) Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem. J.* 343 (1), 115-124.
- Deppenmeier, U. (2002). The unique biochemistry of methanogenesis. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 71, 223-283.
- Donahue, J. L., Bownas, J. L., Niehaus, W. G., Larson, T. J. (2000) Purification and characterization of glpX-encoded fructose 1,6-bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182 (19), 5624- 5627.
- Eichler, J., Adams, M. W. W. (2005) Posttranslational protein modification in *Archaea*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69 (3) 393-425.
- Ferry, J. G. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(1), 13-38.

- Ferry, J. G. (2015). Acetate metabolism in anaerobes from the domain Archaea. *Life*, 5(2), 1454-1471.
- Fujita, Y., Yoshida, K., Miwa, Y., Yanai, N., Nagakawa, E., Kasahara, Y. (1998) Identification and expression of the *Bacillus subtilis* fructose-1, 6-bisphosphatase gene (fbp). *J. Bacteriol.* 180 (16), 4309-4313.
- Furdui, C., Ragsdale, S. W. (2000) The role of pyruvate ferredoxin oxidoreductase in pyruvate synthesis during autotrophic growth by the Wood- Ljungdahl pathway. *J. Biol. Chem.* 275 (38), 28494-28499.
- Galagan, J. E., et al. (2002) The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res.* 12 (4), 532-542.
- Ghambeer, R. K., Wood, H. G., Schulman, M., Ljungdahl, L. (1971) Total synthesis of acetate from CO₂. III. Inhibition by alkylhalides of the synthesis from CO₂, methyltetrahydrofolate and methyl-B₁₂ by *Clostridium thermoaceticum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 143 (2), 471-484.
- Gocheva, Y. G., Krumova, E. T., Slokoska, L. S., Miteva, J. G., Vassilev, S. V., Angelova, M. B. (2006) Cell response of antarctic and temperate strains of *Penicillium spp* to different growth temperature. *Mycol. Res.* 110 (11), 1347-1354.
- Huang, H. D., Lee, T. Y., Tzeng, S. W., Horng, J. T. (2005) KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res.* 33 (Web Server issue): W226-229.
- Jasso-Chávez, R., Santiago-Martínez, M. G., Lira-Silva, E., Pineda, E., Zepeda-Rodríguez, A., Belmont-Díaz, J., Encalada, R., Saavedra, E., Moreno-Sánchez, R. (2015) Air-adapted *Methanosarcina acetivorans* shows high methane production and develops resistance against oxygen stress. *PLoS One.* 10 (2), e0117331.
- Jasso-Chávez, R., Apolinario, E. E., Sowers, K. R., Ferry, J. G. (2013) MrpA functions in energy conversion during acetate-dependent growth of *Methanosarcina acetivorans*. *J. Bacteriol.* 195 (17), 3987-3994.
- Kenealy, W. R., Zeikus, J. G. (1982) One-carbon in methanogenesis: Evidence for synthesis of a two carbon cellular intermediate and unification of catabolism and anabolism in *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* 151 (2), 932-941.
- Kin, S., Lee, S. B. (2005) Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner-Doudoroff pathway. *Biochem. J.* 387 (1), 271-280.

- Kletzin, A. (2007) General characteristics and important model organisms. En: Cavicchioli R. Archaea: Molecular and cellular biology Chapter 2. (pp 14-92) U.S.A. *ASM press*.
- Koerdt, A., Gödeke, J., Berger, J., Thormann, K.M., Albers, S.V. (2010). *Crenarchaeal* biofilm formation under extreme conditions. *PLoS One*. 5 (11), e14104.
- König, H., Nusser, E., Stetter, K. O. (1985) Glycogen in *Methanobolus* and *Methanococcus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 28 (3), 265-269.
- Laine, R., Deville-Bonne, D., Auzat, I., Garel, J. R. (1992) Interaction between the carboxyl groups of Asp127 and Asp129 in the active site of *Escherichia coli* phosphofructokinase. *Eur. J. Biochem.* 207 (3), 1109-1114.
- Lazcano, A., Miller, S. L. (1999). On the origin of metabolic pathways. *J. Mol. Evol.* 49 (4): 424-431. 49:424-431.
- Lessner, D. J., Li, L., Li, Q., Rejtar, T., Andreev, V. P., Reichlen, M., Hill, K., Karger, B. L., Ferry, J. G. (2006). An unconventional pathway for reduction of CO₂ to methane in CO-grown *Methanosarcina acetivorans* revealed by proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103 (47), 17921-17926.
- Li, L., Li, Q., Rohlin, L., Kim, U., Salmon, K., Rejtar, T., Gunsalus, R. P., Karger, B. L., Ferry, J. G. (2007) Quantitative Proteomic and Microarray Analysis of the archaeon *Methanosarcina acetivorans* grown with acetate versus methanol. *J. Proteome Res.* 6 (2), 759-771.
- Li, Q., Li, L., Rejtar, T., Karger, B. L., Ferry, J. G. (2005) The proteome of *Methanosarcina acetivorans*. Part I, an expanded view of the biology of the cell. *J Proteome Res.* 4 (1), 112-128.
- Li, Q., Li, L., Rejtar, T., Lessner, D. J., Karger, B. L., Ferry, J. G. (2006) Electron transport in the pathway of Acetate conversion to methane in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *J. Bacteriol.* 188 (2), 702-710.
- Lira-Silva, E., Santiago-Martínez, M. G., García-Contreras, R., Zepeda-Rodríguez, A., Marín-Hernández, A., Moreno-Sánchez, R., Jasso-Chávez, R. (2013) Cd²⁺ resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis. *Environ. Microbiol. Rep.* 5 (6), 799-808.
- Lira-Silva, E., Santiago-Martínez, M. G., Hernández-Juárez, V., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R., Jasso-Chávez R. (2012) Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PloS One*, 7 (11), e48779.

- Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C., Rodríguez-Enríquez, S., Encalada, R., Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E. (2011) Modeling cancer glycolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807 (6), 755-767.
- Mayerhofer, L. E., Macario, A. J., De Macario, E. C. (1992) Lamina, a novel multicellular form of *Methanosarcina mazei* S-6. *J. Bacteriol.* 174 (1), 309-314.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2017) Lehninger: Principles of Biochemistry. *W. H. Freeman*, 7a. edición. 1158 pp.
- Ray, W. K., Keith, S. M., De Santis, A. M., Hunt, J. P., Larson, T. J., Helm, R. F., Kennelly, P. J. (2005) A phosphohexomutase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is covalently modified by phosphorylation on serine. *J. Bacteriol.* 187 (12), 4270-4275.
- Reeves, R. E., Menzies, R. A., San Hsu, D. (1968) The pyruvate-phosphate dikinase reaction. The fate of phosphate and the equilibrium. *J. Biol. Chem.* 243 (20), 5486-5491.
- Ronimus, R. S., Morgan, H. W. (2003) Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hyperthermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. *Archaea.* 1 (3), 199-221.
- Santiago-Martínez, M. G., Encalada, R., Lira-Silva, E., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J. C., Reyes-García, M. A., Saavedra, E., Moreno-Sánchez, R., Marín-Hernández, A., Jasso-Chávez, R. (2016) The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes. *FEBS J.* 283 (10), 1979-1999.
- Satish, K. V., Ferry, J. G., Maranas, C. D. (2010) Metabolic reconstruction of the archaeon methanogen *Methanosarcina Acetivorans*. *BMC Syst. Biol.* 5 (1), 28-28.
- Sato, T., Imanaka, H., Rashid, N., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T. (2004) Genetic evidence identifying the true gluconeogenic fructose-1,6- biphosphatase in *Thermococcus kodakaraensis* and other hyperthermophiles. *J. Bacteriol.* 186 (17), 5799-5807.
- Schafer, T., Schönheit, P. (1993) Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Embden-Meyerhof pathway. *Arch. Microbiol.* 159 (4), 354-363.
- Schlegel, K., Leone, V., Faraldo-Gómez, J. D., Müller, V. (2012) Promiscuous archaeal ATP synthase concurrently coupled to Na⁺ and H⁺ translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109 (3), 947-952.
- Schoner, R., Herrmann, K. M. (1976). 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. Purification, properties, and kinetics of the tyrosine-sensitive isoenzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 251(18), 5440-5447.

- Siebers, B., Schönheit, P. (2005). Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr Opin Microbiol.* 8 (6), 695-705.
- Siebers, B., Tjaden, B., Michalke, K., Dörr, C., Ahmed, H., Zaparty, M., Gordon, P., et al., (2004) Reconstruction of the central carbohydrate metabolism of *Thermoproteus tenax* by use of genomic and biochemical data. *J. Bacteriol.* 186 (7), 2179-2194.
- Smyer, J. R., Jeter, R. M. (1989) Characterization of phosphoenolpyruvate synthase mutants in *Salmonella typhimurium*. *Arch. Microbiol.* 153 (1), 26–32.
- Sowers, K. R., Baron, S. F., Ferry, J. G. (1984). *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47(5), 971-978.
- Srivastava, P., Kowshik, M. (2013) Mechanisms of metal resistance and homeostasis in *Haloarchaea*. *Archaea* 1(1), e732864.
- Suharti, S., Wang M., de Vries S., Ferry J. G. (2014) Characterization of the RNFB and RNFG subunits of the RNF complex from the archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PLoS One.* 9, E97966.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41 (1), 100–180.
- Thauer, R. K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology.* 144(9), 2377-2406.
- Tjaden, B., Plagens, A., Dörr, C., Siebers, B., Hensel, R. (2006) Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase of *Thermoproteus tenax*: key pieces in the puzzle of archaeal carbohydrate metabolism. *Mol. Microbiol.* 60 (2), 287-298.
- Verhees, C.H., Akerboom, J., Schiltz, E., de Vos, W.M., van der Oost, J. (2002) Molecular and biochemical characterization of a distinct type of fructose-1,6-bisphosphatase from *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 184 (12), 3401–3405.
- Wächtershäuser, G. (1990). Evolution of the first metabolic cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 (1): 200-204.
- Welte, C., Deppenmeier, U. (2014) Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetoclastic methanogens. *Biochim. Biophys. Acta.* 1837 (7), 1130-1147.
- WMO Greenhouse Gas Bulletin. (2015). The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2014. World Meteorological Organization. Sitio web consultado en enero de 2017: <http://www.wmo.int/gaw>

- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (12), 4576-4579.
- Wood, T. K. (2016). Metabolic manipulation of methanogens for methane machinations. *Microb. Biotechnol.* doi:10.1111/1751-7915.12425.
- Zevenhuizen, L. P. (1992) Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 61 (1), 61–68.

V. INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

TABLAS

Tabla 1. Estructura y función de coenzimas y cofactores involucrados en la metanogénesis de <i>Methanosarcina acetivorans</i>	08
Tabla 2. Parámetros cinéticos de la PPDK de <i>M. acetivorans</i>	53
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la PYK y PPDK de <i>M. acetivorans</i>	64

FIGURAS

Figura 1. Metanogénesis a partir de metanol en <i>Methanosarcina acetivorans</i>	15
Figura 2. Metanogénesis a partir de acetato en <i>Methanosarcina acetivorans</i>	18
Figura 3. Esquema condensado de las vías de la síntesis y la degradación de glucosa en organismos del Dominio <i>Archaea</i>	22
Figura 4. Estrategia experimental general del proyecto.	27
Figura 5. Enzimas involucradas en la interconversión de Fru6P a Fru1,6BP	76
Figura 6. Frasco tipo ampollita y vámara de anaerobiosis	116

GRAFICAS

Grafica 1. Cinética hiperbólica de la PPDK de <i>M. acetivorans acetivorans</i>	52
Grafica 2. Cinética hiperbólica de la FruBPasa de <i>M. acetivorans</i>	55
Grafica 3. Modulación de la velocidad de la FruBPasa de <i>M. acetivorans</i> por AMP.....	56
Grafica 4. Efecto del citrato sobre la velocidad de la FruBPasa en extractos de <i>M. acetivorans</i>	57
Grafica 5. Trazo representativo del efecto del citrato y el AMP sobre la velocidad de la FruBPasa en extractos de <i>M. acetivorans</i>	58
Gráfica 6. Modulación de la HPI de <i>M. acetivorans</i> por Ery4P.....	59
Gráfica 7. Trazo representativo de efecto de la eritrosa 4-fosfato (Ery4P) sobre la velocidad de la HPI en extractos de <i>M. acetivorans</i>	60
Gráfica 8. Modulación de la PYK de <i>M. acetivorans</i> por ATP	62
Gráfica 9. Modulación de la PYK de <i>M. acetivorans</i> por diferentes metabolitos.....	63
Gráfica 10. Nivel de mRNA de genes involucrados en la posible interconversión de PEP a PYR ..	66
Gráfica 6.1.2. Curvas estándar de metano.....	118
Gráfica 6.1.3. Curvas estándar de metanol.....	120

VI. ANEXOS

6.1. Métodos destacados

6.1.1. Medio de cultivo y crecimiento celular

La cepa de *Methanosarcina acetivorans* C2A que fue utilizada para el desarrollo de este proyecto fue donada por el Profesor James G. Ferry de la Universidad Estatal de Pensilvania, Estados Unidos. Este microorganismo metanogénico fue cultivado en condiciones anaerobias en un medio denominado *High salt* (HS medium), cuya composición química se asemeja a las características del agua de mar (Sowers *et al.*, 1984).

Los componentes del medio de cultivo fueron: 0.4 M NaCl, 45 mM NaHCO₃, 24 mM KCl, 0.001% (p/V) resazurina (indicador del estado redox del medio), 110 mM MgCl₂, 1.4 mM CaCl₂; 18 mM NH₄Cl, 1.65 mM cisteína, mezcla de vitaminas [150 nM tiamina (B₁), 132 nM riboflavina (B₂), 400 nM ácido nicotínico (B₃), 228 nM ácido pantoténico (B₅), 490 nM piridoxina·HCl (B₆), 82 nM biotina (B₈), 45 nM ácido fólico (B₉), 7.4 nM cobalamina (B₁₂), 364 nM ácido *p*-aminobenzóico (PABA) y 242 nM ácido lipoico], mezcla de minerales [78.4 μM ácido nitrilotriacético, 122 μM MgSO₄·7H₂O, 27 μM MnSO₄·H₂O, 183.5 mM NaCl, 3.6 μM FeSO₂·7H₂O, 3.6 μM CoSO₄, 9 μM CaCl₂, 5.8 μM ZnCl₂, 0.4 μM CuSO₄·5H₂O, 0.2 μM AlK(SO₄)₂, 1.6 μM H₃BO₃, 1.2 μM NaMoO₄ y 10 μM NiCl₂·6H₂O], 0.1 M de KH₂PO₄ y 0.025% (p/V) de Na₂S·9H₂O. Este medio de cultivo fue suplementado con 240 mM de metOH como fuente de carbono externa y se preparó en condiciones anaerobias, utilizando una cámara de anaerobiosis marca COY (Michigan, USA) que contenía una atmósfera de 80 % N₂, 15 % CO₂ y 5 % H₂ (v/v). El oxígeno disuelto en el medio de cultivo fue eliminado mediante el intercambio gaseoso (burbujeo

constante con la mezcla de gases) durante cuatro horas y por la adición del sulfuro y la cisteína reducida.

Para mantener el ambiente anaerobio, dentro de la cámara de anaerobiosis se vertieron 50 mL de medio de cultivo en frascos tipo ampolleta de 100 mL de capacidad y fueron cerrados herméticamente con un tapón de hule y un arillo metálico. Posteriormente fueron esterilizados por autoclave a 120 libras/in² de presión y 125°C durante 30 minutos.

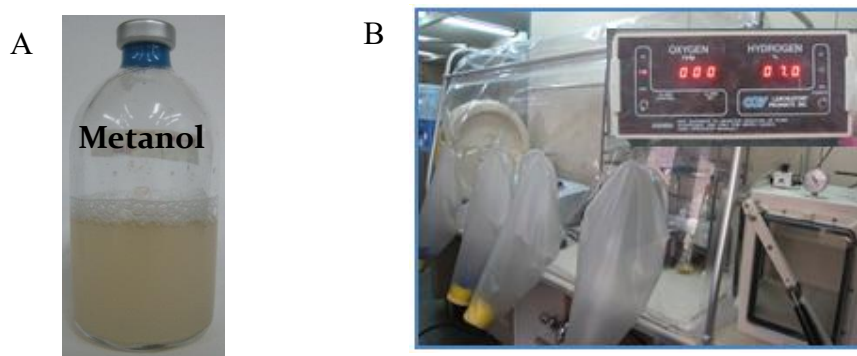


Figura 6. Frasco tipo ampolleta con medio de cultivo y células (A). Cámara de anaerobiosis (B).

Los cultivos fueron iniciados con la adición de un inóculo de células (2 mg de proteína) al medio de cultivo fresco. Las células proveían de cultivos incubados a 37° C sin agitación durante 55-60 horas (final de la fase logarítmica de crecimiento).

El crecimiento celular a través del tiempo de cultivo fue monitoreado midiendo la densidad óptica a 600 nm del cultivo, determinando la producción de gas metano y los cambios en el contenido total de proteína.

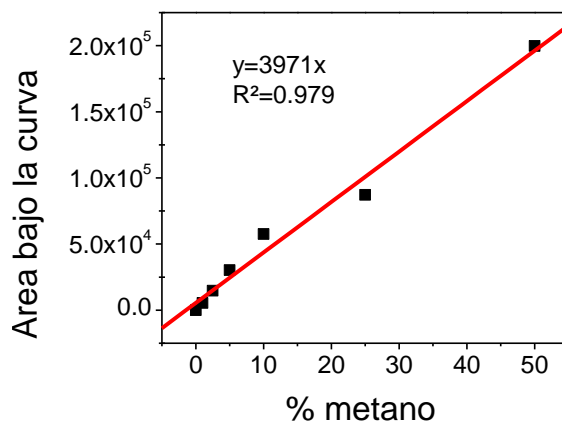
6.1.2. Cuantificación de gas metano

La cuantificación de gas metano producido se utilizó como indicativo del crecimiento celular, debido a que la cantidad de metano generado está relacionado con un aumento en la densidad celular e indicó que las células estaban metabólicamente activas. Este parámetro es utilizado con frecuencia para observar la cinética de crecimiento de los organismos metanogénicos (Sowers *et al.*, 1984; Lira-Silva *et al.*, 2012).

La cantidad de metano se determinó utilizando un cromatógrafo de gases (Shimadzu GV2012) que cuenta con una columna capilar HP-PLOT/U (Agilent, USA) de 30 metros de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 10 μm de capa (*film thickness*) y con un detector de Ionización de Flama. El método que se utilizó tuvo las siguientes características: SPL1, temperatura = 150°C, presión= 75 Pa, flujo total=40.2 mL/min, flujo de columna=1.43 mL/min, flujo de purga= 3 mL/min y una relación aire: muestra = 25:1 (*Split*); la temperatura de la columna fue de 100°C y de 190°C para el FID (*Flame Ionization Detector*). El tiempo de retención del metano fue de 2.56 min, el cual se identificó inyectando muestras estándar de metano comercial y con la información proporcionada por el fabricante de la columna. La fase móvil del cromatógrafo de gases fue una mezcla de aire, hidrógeno y helio.

La sobrepresión del metano producido por los cultivos de *M. acetivorans* se liberó con ayuda de una jeringa de plástico y se midió el volumen. En el cromatógrafo de gases se inyectaron 5 μL de la atmósfera interna del matraz (*headspace*) con ayuda de una jeringa Hamilton de 10 μL de capacidad.

La cantidad de metano producido se determinó por la interpolación de los valores del área bajo la curva de cada muestra y con base en una curva estándar.



Gráfica 6.1.2. Curvas estándar de metano.

Para calcular la cantidad de moles de metano presente en cada muestra se utilizó el procedimiento siguiente, el cual considera la Ley de los gases ideales y los valores obtenidos para la curva estándar. A continuación se muestra un ejemplo:

1) Interpolación del área bajo la curva utilizando los valores de la curva estándar. Para este caso, 10% de metano equivale a un área bajo la curva de 57511 unidades arbitrarias y el área bajo la curva de la muestra de interés fue de 1463140 unidades arbitrarias.

$$(4630 \cdot 10\%) / 57511 = 0.81 \%$$

$$0.81\% = 0.81 \text{ mL gas metano en } 100 \text{ mL gas total (mezcla de gases).}$$

2) Se consideraron los 0.005 mL de gas que fue inyectados en el cromatógrafo de gases:

$$(0.81 \text{ mL} \cdot 0.005 \text{ mL}) / 100 \text{ mL gas} = 4.05 \times 10^{-5} \text{ mL}$$

3) Se consideró el volumen total del frasco (100 mL):

$$(4.05 \times 10^{-5} \text{ mL} \cdot 100 \text{ mL}) / 0.005 \text{ mL} = 0.81 \text{ mL} = 8.1 \times 10^{-4} \text{ L}$$

4) Se utilizó la Ley general de los gases ideales ($P V = n R T$) a 0.77 atm y 25° C.

$$n = 8.1 \times 10^{-4} \text{ L} / (31.8 \text{ L/mol}) = 2.55 \times 10^{-5} \text{ mol de metano}$$

$$= 25.5 \text{ } \mu\text{mol de metano}$$

5) Si es necesario, el volumen del gas que fue despresurizado del frasco de cultivo debe ser considerado para obtener la cantidad total de gas producido.

6.1.3. Cuantificación de metanol remanente

Se cuantificó el metanol remanente del medio de cultivo para conocer el consumo de la fuente de carbono. El metanol fue cuantificado por cromatografía de gases en un equipo Shimadzu GC2010, el cual cuenta con una columna capilar HP-PLOT/U (Agilent, USA) de 30 metros de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 10 μm de capa (*film thickness*) y con un detector de Ionización de Flama. Estándares de metanol comerciales fueron inyectados para hacer la identificación de cada componente por su tiempo de retención.

A continuación se muestra un ejemplo para calcular la cantidad de moles de metanol presente en cada muestra:

- 1) Se partió de un stock comercial de metanol absoluto, cuya concentración fue de 246.4 M
- 2) A cada litro de medio de cultivo se le agregaron 10 mL del stock de metanol, por lo que la concentración en cada frasco quedó de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} &246.4 \text{ mM de metanol en } 50 \text{ mL de cultivo} \\ &= 246.4 \text{ moles/L de metanol} \\ &= 12.32 \text{ mmoles de metanol en } 0.05 \text{ L de medio de cultivo} \end{aligned}$$

- 3) En el cromatógrafo de gases se inyectan 2 μL del medio de cultivo.

$$12.32 \text{ mmoles de metanol} = 50 \text{ mL}$$

Por lo tanto,

$$\begin{aligned} &4.92 \times 10^{-4} \text{ mmoles de metanol en } 2 \times 10^{-3} \text{ mL de medio de cultivo} \\ &= 0.492 \text{ } \mu\text{moles de metanol} = 362606 \text{ UA de } \text{área bajo la curva} \end{aligned}$$

4) Posteriormente se inyectaron volúmenes diferentes del stock de metanol absoluto (1, 2 y 5 μ L) para la elaboración de una curva estándar (mmol de metanol *versus* valor de área bajo la curva).

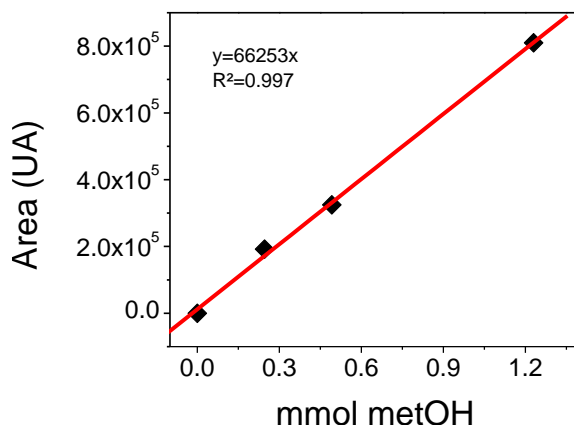


Figura 6.1.3. Curvas estándar de metanol

5) Los valores de área bajo la curva que se obtuvieron en cada inyección de las muestras (medios de cultivo con células) fueron utilizados para calcular la cantidad de metanol remanente en el medio a tiempos diferentes de cultivo usando la curva estándar.

6.1.4. Cuantificación del contenido intracelular de glucógeno

Para el aislamiento del glucógeno, las muestras biológicas provinieron de cultivos celulares de 3-5 mg de proteína que fueron re-suspendidos en 300 μ L de buffer TME (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM de $MgCl_2$ y 1 mM EGTA).

Las células (contenidas en los 300 μ L de TME) fueron lisadas con la adición de 10% (v/v) de KOH 30%, mezcladas fuertemente (vórtex) y calentadas a 80° C durante 60 minutos. El homogenado celular fue agitado constantemente para facilitar la ruptura

celular. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas en hielo y se les adicionaron 100 μ L de Na_2SO_4 al 6% y 1 mL de etanol absoluto (100%) para precipitar a los polisacáridos y eliminar a los monosacáridos solubles. La mezcla fue incubada a 4° C durante toda la noche (*overnight*).

Después, la muestra fue centrifugada a 15462 x g (14,000 rpm) durante 5 minutos a 4° C. El botón fue re-suspendido en 1 mL de etanol al 80% y centrifugado nuevamente a 15462 x g (14,000 rpm) durante 5 minutos a 4° C. El botón blanco (glucógeno aislado) fue re-suspendido en 0.5 mL de 0.2 M de acetato de sodio pH 4.8 y 5 U de *alfa*-amiloglucosidasa. La mezcla fue incubada a 37° C durante toda la noche (*overnight*) para permitir la hidrólisis completa del glucógeno. La mezcla fue neutralizada con KOH/Tris (3 M/0.1 M). Los equivalentes de glucosa fueron determinados mediante un ensayo enzimático acoplado, utilizando 0.02 mL de glucógeno hidrolizado en una mezcla de reacción que contenía 50 mM de Hepes y 20 mM MgCl_2 a pH 7.0 a 25° C, 1 mM de NADP^+ , 4 U de hexocinasa y 2-4 U de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. La reacción fue iniciada con la adición de 5 mM de ATP y monitoreada espectrofotométricamente a 340 nm en un equipo con arreglo de diodos (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

6.1.5. Elaboración de las fracciones citosólicas enriquecidas en condiciones anaeróbicas para la determinación de las actividades enzimáticas

Para la determinación de las actividades enzimáticas de proteínas sensibles a oxígeno (CODH y PFOR) se utilizaron células cosechadas en condiciones de anaerobiosis.

Los cultivos celulares fueron destapados dentro de una cámara de anaerobiosis (Coy, Michigan, USA) que contenía una atmósfera de 80 % N_2 , 15 % CO_2 y 5 % H_2 (v/v). Las células fueron centrifugadas a 3000 x g durante 10 minutos a 4° C utilizando frascos de

cosecha, los cuales fueron cerrados herméticamente dentro de la cámara de anaerobiosis. El botón de células centrifugadas fue re-suspendido y lavado con dos volúmenes de una solución anaerobia que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl₂ y 1 mM de EGTA (Buffer TME).

Las células fueron nuevamente centrifugadas a 3000 x g durante 10 minutos a 4° C y re-suspendidas en 1 mL de buffer de lisis, el cual contenía 0.1 M de fosfato de sodio pH 8.0, 1 mM EDTA y 5 U de DNAsa I. Para favorecer la lisis celular, las muestras fueron mezcladas vigorosamente (vórtex) e incubadas durante 30 minutos dentro de la cámara de anaerobiosis. Posteriormente, el homogenado celular fue centrifugado a 14642 x g durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante (5-8 mg de proteína citosólica) fue utilizado para la determinación de los ensayos enzimáticos.

Para eliminar el exceso de oxígeno, las soluciones utilizadas en estos experimentos fueron burbujeadas con la mezcla de gases dentro de la cámara de anaerobiosis durante al menos cuatro horas.

6.1.6. Determinación del contenido relativo de mRNA

Para este análisis se utilizó la técnica de RT-PCR semicuantitativa. El RNA total se aisló mediante un kit comercial Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, USA) utilizando las células de 20 y 60 horas de cultivo. La integridad del RNA aislado se determinó mediante una electroforesis de un gel de agarosa 0.8%. El cDNA se sintetizó a partir de 5 µg de RNA y por medio del Kit comercial RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El cDNA fue cuantificado espectrofotométricamente a 260 nm y fue utilizado para la PCR de punto final (28 ciclos de 60 segundos a 60° C para el alineamiento) utilizando oligonucleótidos diseñados para cada

gen de interés y para un control de carga (GAPDH). Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2.5% para determinar el nivel de amplificación, el cual fue determinado por densitometría utilizando el software Corel Paint Shop Pro y realizando una doble normalización a partir de los valores determinados para el control de carga (GADPH) y la comparación con el nivel de células de 20 y 60 horas de cultivo. El valor de 100% fue la condición en la cual hubo una expresión mayor del gen de interés.

6.1.7. Clonación y sobre-expresión heteróloga de enzimas recombinantes

6.1.7.1. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos para cada gen fueron diseñados con base en los sitios de restricción. Las enzimas de restricción que fueron utilizadas para ambos genes fueron las siguientes: **EcoRI** (GAATTC) y **SacI** (GAGCTC).

a) ADP-specific phosphofructokinase (EC:2.7.1.146)

> mac: MA3563 (pfk)

gtggacatagaagaatgggaacaacgccatgcagaagcgtttataatgcaaaagaagcccttcttatctggacgggatgtttgta
gctataacagcaatatagatgctatcaggcactgactgaagaagacctgtcaaagctgtcgggtttttgatgagtcgatatcca
ggacagggtagcagcataccgagagagattgcagaacctctgactttgtgccaggtgcttattccatcgggaaggaaaagc
cgcagaagtccccgatatacagcagacattcatgagtggctcaaagagcaccttggttcgactacgcccgcatgggcgggcag
gcagggattattcgaatccttggtcggctagggttaaaaaagtggtagcttacgtcccctggcttccgaggaacaggcagaat
atftacagctacggggaatatcctgcatccgaagggtgaaaacggaaaggtcctcctgaaacctccgggagaagccttcaaacc
gggatcgggtcaaaagtcaactggatcctgagtattcctaagacatgaatgtaacatgtgccgggaacacctcaaagtcccag
ggataatcgctgatcatctctcccgctctaaatggctccgctggacatggataagcagatttacgaacagctcgacacactcctg
ccggttgacggggcaatgcttccgggtatcagatgataaaagaggaatatgaagacgggtccactataaagattatgcaaaaatt
ccgtaaaagtatcgaaaagctgaagtcctgaacctgaactccgcatccatgtggaacttacatccagaaccggcttataag
gaaagctattctaccgaaattgtgccaggcacgtccattccctgggccttgacaccgtggaggtggcaaatgcctgaactgct
gggacatgaggaactgtcctattccgtaatcaggaaaggggaaaacgggattatgtccctctaccagggggctgtccagctcatga

aagacctggatctcgaagagtccatgtccattcgtcggttttatatctgcatcctggcaaaaggccaccctcttacctgaaagaa
cacagggactccctgctttttctcggctcctggcagctgctcaggccctcaacggaaatcgcagaaccttgcggaagccgaagcc
gggctggaagtaccggctcgtccatagggctggaagacctggaaaactccagctgtactgcacgggtagaagctctgtacccc
ggacgagtttgagtacggatatgtctacgggtcggaaacatgacgcgattctcattcctccaaggtggtggagaggcctaaagctac
agtagggataggagatacgatttctgcaggagctttgtgccatgcttgcaagattaaa **cagaaacattcagggaaataa**

Oligonucleótidos para *pfkI*

5' gaa ttc gtg gac ata gaa gaa 3'

5' gag ctc tta ttt ccc tga atg ttt ctg 3'

b) Fructose 1,6-Bisphosphatase II(EC:2.7.1.146)

> mac: Gene MA1152 (fbpaseII)

atgcctcatccaagaccgtagaagagatgtttgagtctgccgggccgattgaatacaggttactgccaggctcattcatgtgacc
gaagctgctgcaattgcagcagcctatcagatgggacgcggggacaaacactttgctgaccaggtagcagtcgcctccatgcgaa
gaatgctgaacaagcttgacatgaaaggcataattaaataggggaaggagagaggacgaagctccatgctttatataaggaga
agaggtcgggacagagaacggagatctcagggtgatattgcagtcgacccccctggaaggcacaaccttacggcagacgggtg
ccccggctcgggtgagttatggcaatggctgaaaggggagggatctccacggccctgatattatggacaagattgtttagg
gcccgatgctcgttcggtatgaagaagagcatcctggcgaaaggatcgacctgatgcgcctgtcagtcataacctgaaatcgttgc
aaaagccctcggaaagaaaggttgaggaactgtagtcgtgatccttgaccgccaaggcatgccagaagataaccgaaatcgg
gaagctggagcccgtgtgaggctggttaccgatggagacctcatgccaggcgtgcaactgcgggtccgaggttcaggcattcacg
tggtcatgggggcagggcgggtcgggagaagctgtcctgactgctgcagcaatcaagatcctgggtggaaaaatccttgaaggctt
gtcctgccaaccgtagcaaacggtaaaaccaaggaagatcgacgaagaaatagaggaaaagatgccaggctcgaagcgt
gggaattacccttgagaacattaatgatattcttgatattgataaactgttctgtaaggatgtcatttttccgcaacagccgtaactc
cgggccacttctgcgcgaagtcaacctttcggaggcggggatgccagagtacacacggtttctatgggggcatccggagctgtc
aggttcacggacagatctatatcaaggataagcgggag **actccactctacctgtaa** 3'

Oligonucleótidos para *fbpaseII*

5' gaa ttc atg cct cat cca aag acc 3'

5' gag ctc tta cag gta gag tgg agt 3'

6.1.7.2. Amplificación del gen por PCR utilizando la *Pfu* DNA pol

Para la amplificación de ambos genes de *Methanosarcina acetivorans* (*pfk1* y *frubpasa II*) se utilizó una DNA polimerasa aislada del arqueón hipertermófilo *Pyrococcus furiosus* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

La mezcla de reacción contenía los componentes siguientes: 5 μ L del buffer *Pfu* 10X con 20 mM de $MgSO_4$, 0.2 mM de cada dNTP, 0.6 μ M (15 pmol) de cada oligonucleótido (*forward* y *reverse*), 1 μ g de DNA genómico, 2.5 U de *Pfu* DNA Polimerasa y agua libre de DNAsas, en un volumen final de 50 μ L.

Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 minutos a 95° C, 40 ciclos de 0.5 minutos de desnaturalización a 95° C, 0.5 minutos de alineamiento a 60° C o 55° C (*pfk1* o *frubpasa II*, respectivamente) y 1.5 minutos de extensión a 72° C, seguidos de un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72° C.

Los productos de PCR fueron verificados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y purificados para su clonación.

6.1.7.3. Purificación del producto de PCR

Se utilizó el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, Wisconsin, USA) el cual fue diseñado para extraer y purificar los fragmentos de DNA de 100 pb a 10 kb a partir de geles de agarosa con Tris-Acetato (TAE) o Tris-Borato (TBE). También se pueden purificar productos de PCR directamente de la reacción de amplificación, sin necesidad de su separación en gel de agarosa. El DNA purificado por este sistema puede ser usado para secuenciación, clonación, digestión con enzimas de restricción o transcripción/traducción *in vitro*.

Después de la separación de los fragmentos de DNA por electroforesis, la banda de interés se cortó y se disolvió en la presencia de isotiocianato de guanidina (Solución de Unión a Membrana, *Membrane Binding Solution*). La muestra se mezcló (vórtex) e incubó a 50-65°C durante 10 minutos hasta que el corte del gel se disolvió completamente. El fragmento de DNA fue separado de la agarosa usando microcentrifugación a 14 642 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Para la separación y purificación del fragmento de DNA se utilizó un sistema de minicolumna SV y microcentrifugación. Al final, el DNA fue eluido en 35 µl de agua libre de nucleasas.

6.1.8. Preparación de células competentes con calcio

La competencia se refiere a la capacidad de las células bacterianas de introducir DNA exógeno. Algunas especies y cepas bacterianas son naturalmente competentes, esto es porque contiene en sus paredes y membranas algunas proteínas dedicadas al transporte de cadenas de DNA del exterior hacia el citoplasma.

El protocolo general que se utilizó en este proyecto fue el siguiente:

- 1.- Para la elaboración del pre-inóculo se utilizaron 5 mL de medio LB SIN ANTIBIOTICO. Se sembró una colonia de *E. coli* TOP 10 y se creció durante toda la noche a 37° C en agitación constante de 200 rpm.
- 2.- Al otro día, se inocularon 50 mL de medio LB con 0.5 mL del pre-inóculo y se dejaron crecer a 37° C hasta alcanzar una absorbancia de 0.4-0.5 (2-3 horas), la cual fue medida a 600 nm. Se utilizó el medio de cultivo sin células como blanco para medir la absorbancia. El cultivo fue enfriado en hielo durante 10 minutos bajo condiciones de esterilidad.
- 3.- El cultivo fue transferido a tubos de 50 mL estériles.
- 4.- Los cultivos fueron centrifugados durante 10 minutos a 3,500 rpm a 4° C.

- 5.- El botón de células fue re-suspendido en 33 mL de una solución de CaCl_2 0.1 M estéril y fría (No vórtex)
6. La solución con células fue incubada en hielo durante 1 hora.
- 7.- La solución fue centrifugada durante 10 minutos a 3,500 rpm a 4° C.
- 8.- EL botón de células fue re-suspendido en 1mL de CaCl_2 0.1 M estéril + 17% de glicerol estéril (No vórtex).
- 9.- Se hicieron alícuotas de células competentes de 0.1 mL en tubos de microcentrifuga estériles de 500 mL de capacidad, los cuales fueron enfriados en hielo previamente. El proceso se realizó lo más rápido posible.
- 10.- Las alícuotas de células competentes fueron almacenadas a -70° C hasta su uso.

6.1.9. Transformación de células competentes

El protocolo general que se utilizó en este proyecto fue el siguiente y se realizó en condiciones de esterilidad:

- 1.- Las células competentes fueron descongeladas en hielo.
- 2.- Se adicionaron 50 μL de células competentes (Top 10) al tubo que contenía el DNA (plásmido con resistencia a algún antibiótico).
- 3.- Las células competentes y el DNA se mezclaron cuidadosamente.
- 4.- Las células competentes y el DNA fueron incubadas en hielo durante 1 hora.
- 5.- Posteriormente, las células competentes fueron incubadas a 42° C durante 1 minuto (choque térmico).
- 6.- Las células competentes fueron enfriadas en hielo e incubadas durante 5 minutos.

7.- A las células competentes se les añadió 1 mL de medio LB SIN ANTIBIÓTICO (10 gramos/L de NaCl, 10 gramos/L de Triptona, 5 gramos/L de extracto de levadura) y se mezclaron cuidadosamente.

8.- Las células fueron incubadas durante 1 hora a 37° C sin agitación.

9.- Las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 3,000 rpm a temperatura ambiente.

10.- El sobrenadante fue desechado (3/4 partes) y las células fueron re-suspendidas en el volumen restante.

11.- Las células fueron plaqueadas en cajas Petri que contenían medio LB con agar al 1.5% y el antibiótico adecuado, de acuerdo a la resistencia que proporcionaría el plásmido.

12.- Las cajas Petri con células fueron incubadas a 37° C durante toda la noche.

Solo crecieron las células que contenían el plásmido con resistencia al antibiótico.

6.1.10. Generación de anticuerpos

6.1.10.1. Preparación del antígeno y esquema de inmunización de la gallina

La proteína purificada (Ma-PFK1 o Ma-FruBPasa II) se disolvió en una solución salina isotónica (1 mg proteína en 0.1 mL de solución). Se inmunizaron vía intramuscular (I.M.) dos gallinas criollas de 54 semanas de edad a través de la aplicación de 3 inoculaciones por ave de 0.2 mg de proteína purificada, con un intervalo entre cada aplicación de 7 días. Cada inoculación fue una mezcla a volúmenes iguales de antígeno con adyuvante completo de Freund (Sigma, St Louis, MO, USA) en un volumen final de 0.4 mL. Se utilizaron los huevos del día 11, posterior a la última inoculación.

6.1.10.2. Purificación de los anticuerpos

El protocolo de purificación de los IgY's se basó al reportado por Polson y colaboradores (1980), con algunas modificaciones que se describen a continuación:

- Las yemas del huevo se separaron de la clara de manera individual, se lavaron cuidadosamente con agua para remover la mayor parte posible de la clara. Una vez lavadas, las yemas se vaciaron por medio de un embudo de vidrio y se rompieron para liberar el contenido en una probeta de vidrio graduada. Se añadieron dos volúmenes de amortiguador (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 0.1 M, azida de sodio al 1%, pH 7.5) por cada volumen de yema y se mezclaron cuidadosamente. Posteriormente, se añadió polietilenglicol 8000 (PEG-8000) previamente pulverizado hasta obtener una concentración final de 3.5% (p/V) para permitir la separación de los lípidos y la vitelina. La mezcla se agitó suavemente hasta que todo el polímero se disolvió. La mezcla se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 14,000 x g durante 10 minutos. Esta centrifugación generó la formación de tres fases en el tubo de centrífuga:

- a) Una capa de grasa amarilla sobre la superficie del fluido
- b) Un sobrenadante claro
- c) Una capa flexible de vitelina que representó una tercera parte del volumen total de las sustancia en el tubo de centrífuga.

El sobrenadante claro y la capa de grasa se decantó cuidadosamente en un embudo con un tapón delgado de algodón en el cuello. El algodón detuvo la capa de grasa y dejó pasar únicamente el sobrenadante. Este paso se repitió una vez más. Se midió el volumen del filtrado para añadir suavemente más PEG-8000 pulverizado a una concentración final de 12% (p/V), lo que provocó la precipitación total de los IgY's. El precipitado se concentró

por centrifugación a 14,000 x g durante 10 minutos. El botón se re-suspendió con solución amortiguadora en el volumen original de las yemas y las IgY's se volvió a precipitar (los dos pasos anteriores). Los botones obtenidos se compactaron por centrifugación a 14,000 x g durante 10 minutos y se eliminó el exceso de PEG-8000. Este paso se repitió dos veces.

Los botones se re-suspendieron en el menor volumen posible de solución amortiguadora. Se realizó una diálisis con 3 L de PBS pH 7.5 a 4° C durante toda la noche para mejorar la pureza de los anticuerpos. El grado de pureza de los anticuerpos fue determinada mediante la técnica de SDS-PAGE al 12%.

6.2. Otras publicaciones

Durante mis estudios de posgrado colaboré en algunos proyectos relacionados con mi área de investigación científica. A continuación se enlistan y se presentan los artículos en los cuales colaboré con datos experimentales:

- 1) **Santiago-Martínez MG**, Lira-Silva E, Encalada R, Pineda E, Gallardo-Pérez JC, Zepeda-Rodríguez A, Moreno-Sánchez R, Saavedra E & Jasso-Chávez R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of Hazard Materials*. 288:104-112
- 2) Jasso-Chávez R, **Santiago-Martínez MG**, Lira-Silva E, Pineda E, Zepeda-Rodríguez A, Belmont-Díaz J, Encalada R, Saavedra E & Moreno-Sánchez R. (2015). Air-adapted *Methanosarcina acetivorans* shows high methane production and develops resistance against oxygen stress. *PLoS One*. 10(2):e0117331.
- 3) Lira-Silva E, **Santiago-Martínez MG**, García-Contreras R, Zepeda-Rodríguez A, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R & Jasso-Chávez R. (2013). Cd²⁺ resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis. *Environmental Microbiology Reports*. 5(6):799-808.
- 4) Lira-Silva E, **Santiago-Martínez MG**, Hernández-Juárez V, García-Contreras R, Moreno-Sánchez R, Jasso-Chávez R. (2012). Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PLoSOne*. 7(11):e48779.



Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions



M. Geovanni Santiago-Martínez^a, Elizabeth Lira-Silva^a, Rusely Encalada^a, Erika Pineda^a, Juan Carlos Gallardo-Pérez^a, Armando Zepeda-Rodríguez^b, Rafael Moreno-Sánchez^a, Emma Saavedra^a, Ricardo Jasso-Chávez^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México

^b Facultad de Medicina, UNAM, México City, México

HIGHLIGHTS

- The protist *Euglena gracilis* had the ability to grow and remove large amounts of Cd²⁺ under anaerobic conditions.
- High biomass was attained by combination of glycolytic and mitochondrial carbon sources.
- Routes of degradation of glucose, glutamate and malate under anaerobic conditions in *E. gracilis* are described.
- Biosorption was the main mechanism of Cd²⁺ removal in anaerobiosis, whereas the Cd²⁺ intracellularly accumulated was inactivated by thiol-molecules and polyphosphate.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2014

Received in revised form 5 February 2015

Accepted 9 February 2015

Available online 11 February 2015

Keywords:

Anaerobic metabolism

Biomass production

Heavy metal toxicity

Cadmium pollution

Biosorption

ABSTRACT

The facultative protist *Euglena gracilis*, a heavy metal hyper-accumulator, was grown under photoheterotrophic and extreme conditions (acidic pH, anaerobiosis and with Cd²⁺) and biochemically characterized. High biomass (8.5×10^6 cells mL⁻¹) was reached after 10 days of culture. Under anaerobiosis, photosynthetic activity built up a microaerophilic environment of 0.7% O₂, which was sufficient to allow mitochondrial respiratory activity: glutamate and malate were fully consumed, whereas 25–33% of the added glucose was consumed. In anaerobic cells, photosynthesis but not respiration was activated by Cd²⁺ which induced higher oxidative stress. Malondialdehyde (MDA) levels were 20 times lower in control cells under anaerobiosis than in aerobiosis, although Cd²⁺ induced a higher MDA production. Cd²⁺ stress induced increased contents of chelating thiols (cysteine, glutathione and phytochelatins) and polyphosphate. Biosorption (90%) and intracellular accumulation (30%) were the mechanisms by which anaerobic cells removed Cd²⁺ from medium, which was 36% higher versus aerobic cells. The present study indicated that *E. gracilis* has the ability to remove Cd²⁺ under anaerobic conditions, which might be advantageous for metal removal in sediments from polluted water bodies or bioreactors, where the O₂ concentration is particularly low.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Microalgae have been used to remove or bio-transform residual nutrients and pollutants such as heavy metals from wastewater or sediments [1–4]. Industrial wastewater treatment for selective removal of heavy metal ions, including Pb(II), Hg(II), Cd(II), Ni(II),

V(IV,V), Cr(III,VI), Cu(II) and Zn(II), uses various modern types of ion exchange resins [5]. However, for an efficient clearance of wastewaters, it is required to remove both organic matter and heavy metals, which accumulate in the sludge of bioreactors operating under aerobic or anaerobic conditions [6]. Heavy metal removal by microalgae has attracted attention because they also have the ability to remove both CO₂ and organic waste [3,7]. Then, to develop efficient treatments of wastewaters or polluted sediments by bioremediation, microorganisms able to grow in the presence and absence of O₂ and with a broad metabolic plasticity are required.

The flagellate protist algae-like *Euglena gracilis* is a cosmopolitan organism able to grow under heterotrophic, photosynthetic

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano # 1, Sección XVI, Tlalpan, México D.F. 14080, México. Tel.: +52 55 55732911; fax: +52 55 5573 0994.

E-mail address: rjasso.cardiol@yahoo.com.mx (R. Jasso-Chávez).

RESEARCH ARTICLE

Air-Adapted *Methanosarcina acetivorans* Shows High Methane Production and Develops Resistance against Oxygen Stress

Ricardo Jasso-Chávez^{1*}, M. Geovanni Santiago-Martínez¹, Elizabeth Lira-Silva¹, Erika Pineda¹, Armando Zepeda-Rodríguez², Javier Belmont-Díaz¹, Rusely Encalada¹, Emma Saavedra¹, Rafael Moreno-Sánchez¹

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico, ² Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico

* rjass_cardiol@yahoo.com.mx



OPEN ACCESS

Citation: Jasso-Chávez R, Santiago-Martínez MG, Lira-Silva E, Pineda E, Zepeda-Rodríguez A, Belmont-Díaz J, et al. (2015) Air-Adapted *Methanosarcina acetivorans* Shows High Methane Production and Develops Resistance against Oxygen Stress. PLoS ONE 10(2): e0117331. doi:10.1371/journal.pone.0117331

Academic Editor: Stephan Neil Witt, Louisiana State University Health Sciences Center, UNITED STATES

Received: September 16, 2014

Accepted: December 22, 2014

Published: February 23, 2015

Copyright: © 2015 Jasso-Chávez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was partially supported by grants Nos. 156969 (RJC), 178638 (ES) and 80534 and 123636 (RMS) from CONACyT, Mexico and No. PICS08-5 (RMS, RJC) from ICYTDF, Mexico. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Methanosarcina acetivorans, considered a strict anaerobic archaeon, was cultured in the presence of 0.4–1% O₂ (atmospheric) for at least 6 months to generate air-adapted cells; further, the biochemical mechanisms developed to deal with O₂ were characterized. Methane production and protein content, as indicators of cell growth, did not change in air-adapted cells respect to cells cultured under anoxia (control cells). In contrast, growth and methane production significantly decreased in control cells exposed for the first time to O₂. Production of reactive oxygen species was 50 times lower in air-adapted cells versus control cells, suggesting enhanced anti-oxidant mechanisms that attenuated the O₂ toxicity. In this regard, (i) the transcripts and activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase significantly increased; and (ii) the thiol-molecules (cysteine + coenzyme M-SH + sulfide) and polyphosphate contents were respectively 2 and 5 times higher in air-adapted cells versus anaerobic-control cells. Long-term cultures (18 days) of air-adapted cells exposed to 2% O₂ exhibited the ability to form biofilms. These data indicate that *M. acetivorans* develops multiple mechanisms to contend with O₂ and the associated oxidative stress, as also suggested by genome analyses for some methanogens.

Introduction

The reactive oxygen species (ROS) are toxic for most cells because they induce (i) oxidation of polysaccharides and polyunsaturated fatty acids, as well as amino acid residues, particularly of sulfhydryl groups in proteins; (ii) loss of metals in metalloproteins; and (iii) DNA mutations, among many others [1]. Aerobic microorganisms have developed multiple strategies to handle ROS stress including: (i) enzymes that scavenge ROS such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidases (PXs); (ii) protein repair mechanisms such as the thioredoxin system; (iii) DNA damage repair enzymes such as RecA; and (iv) anti-oxidant metabolites such as glutathione, α-tocopherol, carotenes, ascorbate, and trypanothione, which are able to directly inactive ROS [1–4].

Cd²⁺ resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis

Elizabeth Lira-Silva,¹
M. Geovanni Santiago-Martínez,¹
Rodolfo García-Contreras,¹
Armando Zapeda-Rodríguez,²
Alvaro Marín-Hernández,¹ Rafael Moreno-Sánchez¹
and Ricardo Jasso-Chávez^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico City, Mexico.

²Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico.

Summary

To assess what defence mechanisms are triggered by Cd²⁺ stress in *Methanosarcina acetivorans*, cells were cultured at different cadmium concentrations. In the presence of 100 µM CdCl₂, the intracellular contents of cysteine, sulfide and coenzyme M increased, respectively, 8, 27 and 7 times versus control. Cells incubated for 24 h in medium with less cysteine and sulfide removed up to 80% of Cd²⁺ added, whereas their cysteine and coenzyme M contents increased 160 and 84 times respectively. Cadmium accumulation (5.2 µmol/10–15 mg protein) resulted in an increase in methane synthesis of 4.5 times in cells grown on acetate. Total phosphate also increased under high (0.5 mM) Cd²⁺ stress. On the other hand, cells preadapted to 54 µM CdCl₂ and further exposed to > 0.63 mM CdCl₂ developed the formation of a biofilm with an extracellular matrix constituted by carbohydrates, DNA and proteins. Biofilm cells were able to synthesize methane. The data suggested that increased intracellular contents of thiol molecules and total phosphate, and biofilm formation, are all involved in the cadmium resistance mechanisms in this marine archaeon.

Introduction

Organisms respond to heavy metal toxicity through different biochemical mechanisms, such as decreased uptake, active expulsion, chelation and compartmentalization of

metal ions (Cervantes et al., 2006; Haferburg and Kothe, 2007). Thus, control of uptake, trafficking and detoxification of heavy metals are important steps in the complex cellular mechanisms that deal with heavy metal toxicity and confer resistance. Chelators contribute to metal detoxification by buffering cytosolic metal ions. In plants, physiological metal chelators include thiol-containing compounds, such as cysteine (Cys), glutathione (GSH), phytochelatins (PCs) and metallothioneins, and organic acids and amino acids (Clemens, 2001).

Cadmium is a highly toxic non-essential heavy metal that has become a serious contaminant of soils and water bodies, mainly due to anthropogenic activity and inappropriate methods of disposal (Simpson, 1981). This metal strongly interacts with S, O, and N atoms in biomolecules (Sillen and Martell, 1964). A widespread mechanism for Cd²⁺ detoxification in plants and yeast is based on the sequestration of Cd²⁺ by PCs and the subsequent compartmentalization into the vacuole of the PCs-Cd²⁺ complexes (Cobbett, 2000). Synthesis of PCs, and enhanced synthesis of their metabolic precursors Cys, γ-glutamylcysteine (γ-EC), GSH and sulfide (S²⁻), is a commonly used cellular response against Cd²⁺ stress in higher plants, some yeast and algae (for review, see Mendoza-Cózatl et al., 2005). In the Archaea domain, progress has been made on the mechanisms of resistance to heavy metals at the gene expression level (Villafane et al., 2011; Maezato et al., 2012; Orell et al., 2013), but studies on the characterization of the enzymatic activities and biochemical processes involved are scarce.

Some gene sequences encoding heavy metal-exporting proteins putatively involved in the efflux-mediated heavy metal resistance, and many P-type ATPases, have been found in archaeal genomes (Dopson et al., 2003), although no activity of these proteins has been determined as yet. In contrast, activities of P-type Ag⁺ and Cu²⁺ ATPases (Mandal et al., 2002) and the formation of biofilms constituted mainly by carbohydrates, DNA and proteins induced by Cr (VI) and Cu²⁺ have been reported for the extremophile *Archaeoglobus fulgidus* (Lapaglia and Hartzell, 1997).

In acetoclastic methanogens, studies on Cu²⁺ toxicity have been carried out for consortia in digesters or ecological niches (Karri et al., 2006), and the formation of

Received 9 April, 2013; accepted 22 June, 2013. *For correspondence. E-mail rjasso_cardiol@yahoo.com.mx; Tel. (+52) 55 5573 2911; Fax (+52) 55 5573 0994.

Activation of Methanogenesis by Cadmium in the Marine Archaeon *Methanosarcina acetivorans*

Elizabeth Lira-Silva, M. Geovanni Santiago-Martínez, Viridiana Hernández-Juárez, Rodolfo García-Contreras, Rafael Moreno-Sánchez, Ricardo Jasso-Chávez*

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Tlalpan, México D.F., México

Abstract

Methanosarcina acetivorans was cultured in the presence of CdCl₂ to determine the metal effect on cell growth and biogas production. With methanol as substrate, cell growth and methane synthesis were not altered by cadmium, whereas with acetate, cadmium slightly increased both, growth and methane rate synthesis. In cultures metabolically active, incubations for short-term (minutes) with 10 μM total cadmium increased the methanogenesis rate by 6 and 9 folds in methanol- and acetate-grown cells, respectively. Cobalt and zinc but not copper or iron also activated the methane production rate. Methanogenic carbonic anhydrase and acetate kinase were directly activated by cadmium. Indeed, cells cultured in 100 μM total cadmium removed 41–69% of the heavy metal from the culture and accumulated 231–539 nmol Cd/mg cell protein. This is the first report showing that (i) Cd²⁺ has an activating effect on methanogenesis, a biotechnological relevant process in the bio-fuels field; and (ii) a methanogenic archaea is able to remove a heavy metal from aquatic environments.

Citation: Lira-Silva E, Santiago-Martínez MG, Hernández-Juárez V, García-Contreras R, Moreno-Sánchez R, et al. (2012) Activation of Methanogenesis by Cadmium in the Marine Archaeon *Methanosarcina acetivorans*. PLoS ONE 7(11): e48779. doi:10.1371/journal.pone.0048779

Editor: Andy T. Y. Lau, Shantou University Medical College, China

Received: May 18, 2012; **Accepted:** October 1, 2012; **Published:** November 12, 2012

Copyright: © 2012 Lira-Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The funding of the grants described in the manuscript (90619, 80534, 123636 and 156969 from CONACyT and # PICS08-5 from ICYTDF, Mexico) were used for acquisition of lab materials, chemicals and small equipment. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Co-author Rafael Moreno-Sánchez is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials. Also the authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rjass_cardiol@yahoo.com.mx

Introduction

Methanogenesis is the pathway by which ion (H⁺, Na⁺) gradients across the plasma membrane are generated to drive ATP synthesis, with the concomitant production of methane as an end product. Methanogens are strict anaerobes belonging to the *Archaea* domain, which can be found in a broad variety of environments such as anaerobic digesters of sewage treatment plants, landfills, rice paddies, lakes and in the sea sediments, among others [1]. Indeed, these organisms have an essential role in the global carbon cycle by transforming small carbon molecules such as methanol, methylamines, CO₂+H₂, formate, CO and acetate into methane. Because heavy metal pollution may develop in some of these habitats, methanogens may be exposed to this environmental stress with the consequent perturbation of the local ecology. Heavy metal pollution of water resources is now a widespread environmental and public health problem, as a result of their elevated toxicity, which may be exacerbated by their potential bio-magnification effect and accumulation throughout the ecological food webs.

Pollution of coastal zones by heavy metals such as Cd, Pb, Hg and Ni, is a major environmental problem in some regions of the world [2]. Once in the marine environment, these contaminants accumulate in sediments [3]. Cadmium ocean pollution and mobilization has increased exponentially up to 300 thousands per decade, where 40% of the total current pollution derives from anthropogenic activities [4]. In some coastal zones in the Gulf of Mexico, up to 2,550 μg L⁻¹ (22.6 μM) of cadmium has been found, a value far higher than permissible [5]. In other seas and

oceans around the world, cadmium concentrations up to 20.5 μg L⁻¹ and 18,400 μg g⁻¹ in waters and sediments, respectively, have been determined [4]. These cadmium pollution values highlight the importance of determining the toxicity of cadmium in organisms found in sediments, methanogens among them. Depending on the physicochemical environmental characteristics and microbial metabolism, heavy metal contaminants may be released from sediments back into the water. Under such situations, marine sediments may become a secondary source of pollution.

Most studies of microbial communities in the ocean have focused on bacterial diversity in marine sediments and the long-term impact brought about by heavy metals exposure [6]. There are few works about the toxic effect of heavy metals on methanogens in sludge [7] and laboratory strains [8,9]. Remarkably, it has been described that low concentrations of heavy metals are not toxic for methanogens in the sludge, but on the contrary they induce increased methane production [10]. This finding has not been further explored and hence the living components of the consortia affected by the metal have not been identified, and the biochemical mechanisms involved have not been elucidated. In the present work, the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans* was used as a model to assess the effect of cadmium on methanogenesis.