



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS
Biología Evolutiva

Evolución temprana del metabolismo de la metanogénesis

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Israel Muñoz Velasco

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

COMITÉ TUTOR: Dra. María Colín García, Instituto de Geología, UNAM
Dr. Luis Delaye Arredondo Cinvestav unidad Irapuato, I.P.N.

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
Biología Evolutiva

Evolución temprana del metabolismo de la metanogénesis

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Israel Muñoz Velasco

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

COMITÉ TUTOR: Dra. María Colín García, Instituto de Geología, UNAM
Dr. Luis Delaye Arredondo Cinvestav unidad Irapuato, I.P.N.

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 2017

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

OFICIO FCIE/DEP/696/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de septiembre de 2017 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** del (la) alumno(a) **MUÑOZ VELASCO ISRAEL** con número de cuenta **305324690** con la tesis titulada "**Evolución temprana del metabolismo de la metanogénesis**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO**:

Presidente: DR. ANTONIO EUSEBIO LAZCANO-ARAUJO REYES
Vocal: DR. LUIS DAVID ALCARÁZ PERAZA
Secretario: DRA MARÍA COLÍN GARCÍA
Suplente: M. EN C. RICARDO HERNÁNDEZ MORALES
Suplente: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria. Cd. Mx., a 11 de octubre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MJFM/ASR/mnm

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por aceptarme en su programa de alta exigencia académica y brindarme la oportunidad de formarme como maestro en ciencias biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la duración de mis estudios de maestría (número de becario 415961 y número de CVU 696280).

A DGAPA-UNAM por el apoyo económico otorgado al proyecto PAPIIT-IN223916.

A mi Tutor Principal: Dr. Arturo Carlos Il Becerra Bracho por sus enseñanzas y su amplia experiencia, mismas que contribuyen enormemente a mi formación académica.

A los miembros de mi Comité Tutor: Dra. María Colín García y Dr. Luis Delaye Arredondo por sus observaciones, comentarios y sugerencias al trabajo realizado durante los estudios de maestría.

Agradecimientos a título personal

A mi tutore Dr. Arturo Becerra, por la confianza que depositó en mí, sin siquiera conocerme, por todo lo que he aprendido gracias a sus enseñanzas, por brindarme su amistad.

A The Very Great Dominus et Magister Emeritus, Dr. Antonio Lazcano, por brindarme su amistad y por ser tan generoso a la hora de compartir sus conocimientos con todos.

Al Dr. Juli Peretó, por aceptarme en su laboratorio durante mi estancia en Valencia, por su paciencia, enseñanzas y sobre todo por su gran amistad.

Al Dr. Carlos García-Ferrís, por las discusiones que tuvimos durante la estancia, por sus observaciones y sugerencias al trabajo, por su amistad tan sincera.

Agradecimientos especiales a Ricardo Hernández Morales por su asistencia técnica durante la realización de este trabajo.

A Sara Islas por sus sugerencias para mejorar el texto.

A los Macacos, por aceptarme en el grupo desde que ingresé y por el ambiente de compañerismo tan agradable que se crea en el laboratorio.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. María Colín García y el Dr. Luis Delaye Arredondo por su apoyo incondicional durante todo el trabajo de maestría.

Dedicatoria

-A mi familia, por todo su apoyo, especialmente a mi madre porque siempre ha creído en mí y me ha brindado su apoyo incondicional, a mis hermanos por estar siempre presentes en los momentos más difíciles.

-A Yun por su amor incondicional y por ser tan paciente conmigo. Por nunca darse por vencida.

Índice

I	Lista de figuras-----	Pág. 9
	I.2 Lista de tablas y figuras suplementarias-----	Pág. 10
II	Resumen-----	Pág. 11
III	Abstract-----	Pág. 12
IV	Introducción-----	Pág. 13
	IV.1 Aspectos generales de la metanogénesis-----	Pág. 13
	IV.2 Evolución de la metanogénesis -----	Pág. 14
	IV.3 Metabolismos autotróficos y metanogénesis-----	Pág. 17
	IV.4 Tipos de metanogénesis-----	Pág. 18
	IV.4.1 Metanogénesis Hidrogenotrófica-----	Pág. 18
	IV.4.2 Metanogénesis Acetoclástica-----	Pág. 20
	IV.4.3 Metanogénesis basa en compuestos metilados (metilotrónica)-----	Pág. 22
V	Justificación del trabajo-----	Pág. 24
VI	Hipótesis-----	Pág. 25
VII	Objetivo general-----	Pág. 25
	VII.1 Objetivos particulares-----	Pág. 25
VIII	Material y Métodos-----	Pág. 26
IX	Resultados-----	Pág. 29
	IX.1 Metanogénesis hidrogenotrófica-----	Pág. 29
	IX.2 Metanogénesis acetoclástica-----	Pág. 57
	IX.3 Metanogénesis metilotrónica-----	Pág. 69
X	Discusión-----	Pág. 82
	X.1 Metanogénesis Hidrogenotrófica y ruta de Wood-Ljungdahl, posible origen y evolución-----	Pág. 82
	X.2 Metanogénesis acetoclástica-----	Pág. 84
	X.3 Metanogénesis metilotrónica-----	Pág. 86
XI	Conclusiones-----	Pág. 88
XII	Perspectivas-----	Pág. 90
XIII	Material Suplementario-----	Pág. 91
XIV	Referencias bibliográficas-----	Pág. 97

I Lista de figuras

Figura 1	Ciclo del carbono-----	Pág. 14
Figura 2	Rutas metabólicas de la metanogénesis-----	Pág. 30
Figura 3	Filogenia FmdA-----	Pág. 33
Figura 4	Filogenia FmdB-----	Pág. 34
Figura 5	Filogenia FmdC-----	Pág. 35
Figura 6	Filogenia FmdD-----	Pág. 36
Figura 7	Filogenia FmdE-----	Pág. 37
Figura 8	Filogenia FmdF-----	Pág. 38
Figura 9	Filogenia Ftr-----	Pág. 40
Figura 10	Filogenia Mch-----	Pág. 41
Figura 11	Filogenia Hmd-----	Pág. 42
Figura 12	Filogenia Mtd-----	Pág. 43
Figura 13	Filogenia Mer-----	Pág. 44
Figura 14	Filogenia MtrA-----	Pág. 45
Figura 15	Filogenia MtrB-----	Pág. 46
Figura 16	Filogenia MtrC-----	Pág. 47
Figura 17	Filogenia MtrD-----	Pág. 48
Figura 18	Filogenia MtrE-----	Pág. 49
Figura 19	Filogenia MtrF-----	Pág. 50
Figura 20	Filogenia MtrG-----	Pág. 51
Figura 21	Filogenia MtrH-----	Pág. 52
Figura 22	Filogenia McrA-----	Pág. 53
Figura 23	Filogenia McrB-----	Pág. 54
Figura 24	Filogenia McrG-----	Pág. 55
Figura 25	Filogenia SSU-RNA-----	Pág. 56
Figura 26	Filogenia Ack-----	Pág. 60
Figura 27	Filogenia Pta-----	Pág. 61
Figura 28	Esquema CODH/ACS-----	Pág. 62
Figura 29	Filogenia CdhA-----	Pág. 64
Figura 30	Filogenia CdhB-----	Pág. 65
Figura 31	Filogenia CdhC-----	Pág. 66
Figura 32	Filogenia CdhD-----	Pág. 67
Figura 33	Filogenia CdhE-----	Pág. 68
Figura 34	Filogenia MtaA-----	Pág. 73
Figura 35	Filogenia MtaB-----	Pág. 74
Figura 36	Filogenia MtmB-----	Pág. 76
Figura 37	Filogenia MtbB-----	Pág. 77
Figura 38	Filogenia MttB-----	Pág. 78
Figura 39	Filogenia MtbA-----	Pág. 79
Figura 40	Filogenia MtsA-----	Pág. 80
Figura 41	Filogenia MtpA-----	Pág. 81
Figura 42	Línea del tiempo-----	Pág. 83
Figura 43	Representación árbol de la vida (resumen)-----	Pág. 87

I.2 Lista de Tablas y Figuras suplementarias

Tabla 1	Phylum y Órdenes a los que pertenecen los organismos metanógenos	Pág. 16
Tabla 2	Enzimas y reacciones, metanogénesis hidrogenotrófica	Pág. 31
Tabla 3	Presencia-ausencia metanogénesis hidrogenotrófica	Pág. 39
Tabla 4	Presencia-ausencia primeros cinco pasos metanogénesis hidrogenotrófica en Euryarchaeota	Pág. 40
Tabla 5	Enzimas y reacciones, metanogénesis acetoclástica	Pág. 59
Tabla 6	Presencia-ausencia metanogénesis acetoclástica	Pág. 63
Tabla 7	Enzimas y reacciones, metanogénesis metilotrónica	Pág. 71
Tabla 8	Presencia-ausencia metanogénesis metilotrónica	Pág. 75
Fig. Supl. 1	Publicaciones metanogénesis	Pág. 91
Fig. Supl. 2	Estructura química de H ₄ MPT y H ₄ SPT	Pág. 91
Tab. Supl. 1	Modelos evolutivos usados en la construcción de cada filogenia	Pág. 92
Tab. Supl. 2	Presencias y ausencias de CODH/ACS en Euryarchaeota	Pág. 93
Fig. Supl. 3	Heatmap Metanogénesis Hidrogenotrófica	Pág. 94
Fig. Supl. 4	Heatmap Metanogénesis Acetoclástica	Pág. 95
Fig. Supl. 5	Heatmap Metanogénesis Metilotrónica	Pág. 96

II Resumen

Las bacterias productoras de acetato (homoacetogénicas) comparten con las arqueas productoras de metano (metanógenas, específicamente las metanógenas hidrogenotróficas) la ruta autotrófica de fijación de carbono Wood-Ljungdahl (WL). Se sabe que existen seis rutas de este tipo: 1) el ciclo reductor del ácido tricarboxílico (Arnon-Buchanan), 2) el biciclo del 3-hidroxiacetato, 3) el ciclo reductor de las pentosas fosfato (Calvin-Benson-Bassham), 4) la ruta reductora de la acetil-CoA (Wood-Ljungdahl o WL), 5) el ciclo del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato y 6) el ciclo del dicarboxilato-4-hidroxiacetato, de las seis rutas, la ruta WL es la única compartida entre los dominios Bacteria y Archaea, por este motivo ha sido propuesta como una de las rutas autotróficas de fijación de carbono más antiguas, pudiendo estar presente en el Último Ancestro Común (LCA por sus siglas en inglés). Sin embargo, solo la rama carbonilo (originalmente llamada rama “western” y que consiste en la transformación de CO_2 a carbono celular) es la misma en ambos dominios. Mientras que la rama metilo (referida como rama “eastern” y que se encarga de extraer un grupo metilo a partir de CO_2 e H_2) es diferente en cuanto al número de reacciones y por tanto en el número de enzimas. Se sabe que las enzimas de la rama metilo bacteriana y arqueana no son homólogas, incluso si se realiza un estudio a nivel de estructura terciaria.

En este trabajo nos dimos cuenta que algunas enzimas de la rama metilo del WL arqueano (MBWL, por Methyl Branch of Wood-Ljungdahl) están presentes tanto en bacterias como en arqueas no metanógenas. También se observó que estas enzimas tienen una trayectoria evolutiva en la que ha habido múltiples transferencias, así como posibles pérdidas en los linajes no metanógenos, lo cual nos lleva a sugerir que la MBWL no pudo estar en su totalidad presente en el LCA, por tanto tampoco la metanogénesis hidrogenotrófica. Los análisis de las variantes de la metanogénesis mostraron que los primeros cinco pasos de la metanogénesis hidrogenotrófica también se encuentran distribuidos en linajes no metanógenos del dominio Archaea, así como en linajes pertenecientes al dominio Bacteria, que algunas de las enzimas con actividad de metiltransferasa que participan en el aprovechamiento de compuestos metilados se encuentran bien distribuidas en organismos no metanógenos pertenecientes a los dominios Archaea, Bacteria y Eucaria.

Nuestros resultados también mostraron que la metanogénesis hidrogenotrófica es más antigua que las variantes acetoclástica y metilotrófica. Así mismo, la metanogénesis acetoclástica presenta la particularidad de que la evolución de cada subunidad de la monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintasa (CODH/ACS) tipo II nos cuenta una historia evolutiva clara, en la que al menos tres subunidades tienen un origen totalmente arqueano. La metanogénesis metilotrófica parece ser una ruta de salvamento de compuestos metilados, en la que dichos compuestos son incorporados al metabolismo energético.

III Abstract

Acetate producing Bacteria (Homoacetogens) share with methane producing Archaea (Methanogens, specifically hydrogenotrophic methanogens) the autotrophic route of carbon fixation Wood-Ljungdahl (WL) pathway. It is known that there are six routes of this type: 1) Reductive Tricarboxylic Acid Cycle (Arnon-Buchanan), 2) 3-Hydroxypropionate bicycle, 3) Reductive pentose phosphate cycle (Calvin-Benson-Bassham), 4) Reductive acetyl-CoA (Wood-Ljungdahl or WL) pathway, 5) 3-Hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle and 6) Dicarboxylate/4-hydroxybutyrate cycle, of the six routes, the WL pathway is the only one shared by both domains, Archaea and Bacteria, for this reason has been proposed as one of the oldest routes of carbon fixation, maybe present in the Last Common Ancestor (LCA). However, only the carbonyl (originally called "western" and consisting of the transformation of CO₂ to cellular carbon) is the same in both domains. While the methyl branch (referred to as the "eastern" branch and which extracts a methyl group from CO₂ and H₂) is different in terms of the number of reactions and therefore in the number of enzymes. It is known that the enzymes of the bacterial and archaeal methyl branch are not homologous, even if a study is carried out at the tertiary structure level.

In this work we realized that some that some enzymes of methyl branch of archaeal Wood-Ljungdahl pathway (MBWL) are present in bacterias as in non methanogen archaeas too. It was also observed that these enzymes have an evolutionary trajectory in which there have been multiple transferences, as well as possible losses in the non-methanogenic lineages, which leads us to suggest that the MBWL could not be fully present in the LCA, therefore neither hydrogenotrophic methanogenesis. Analyzes of variants of methanogenesis showed that the first five steps of hydrogenotrophic methanogenesis are also distributed in non-methanogenic lineages of the Archaea domain, as well as in lineages belonging to the Bacteria domain, that some of the enzymes with methyltransferase activity involved in the utilization of methylated compounds are well distributed in non-methanogenic organisms belonging to the Archaea, Bacteria and Eukarya domains.

Our results also showed that hydrogenotrophic methanogenesis are more ancient than acetoclastic and methylotrophic methanogenesis. Likewise, acetoclastic methanogenesis presents the peculiarity that the evolution of each subunit of the carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase (CODH/ACS) type II tells us a clear evolutionary history in which at least three subunits have an archaean origin. Methylotrophic methanogenesis seems to be like a salvage pathway of different methylated compounds, in which this compounds are incorporated to energy metabolism.

IV Introducción.

IV.1 Aspectos generales de la metanogénesis.

La producción biológica de metano, denominada metanogénesis, es uno de los pasos finales de la descomposición de la biomasa en ambientes estrictamente anaerobios. Desde el punto de vista ecológico, este proceso metabólico es de suma importancia ya que forma parte integral del ciclo del carbono (**Barber, 2007**). Una parte del metano producido por arqueas metanógenas es consumido por arqueas metano oxidantes y por bacterias metanótrofas, mientras que otra parte se integra a la atmósfera en donde actúa como gas de efecto invernadero (**Offre et al., 2013**) (Figura 1). Se estima que el metano es treinta veces más efectivo como gas de efecto invernadero que el dióxido de carbono, convirtiéndolo en un importante contribuyente del calentamiento global (**Barber, 2007**).

Existen tres distintas formas de producción biológica de metano: i) la denominada metanogénesis hidrogenotrófica, que toma dióxido de carbono (CO₂) e hidrógeno (H₂) como compuestos iniciales y los reduce hasta metano (Figura 2A); ii) la metanogénesis acetoclástica, que transforma el acetato en metano (Figura 2B); y iii) la metanogénesis metilotrófica, que toma diversos compuestos metilados [entre los que destacan metanol, metilaminas (mono, di y trimetilamina) y tioles metilados (dimetilsulfuro y metilmercaptopropionato)] a los que se les extrae un grupo metilo y éste es transformado en metano (Figura 2C) (**Ferry 1999, Whitman et al., 2006, Lessner 2009, Costa y Leight 2014**). Todos los organismos productores de metano son extremadamente sensibles al oxígeno. Esto puede explicarse, en parte, debido a que las enzimas involucradas en el proceso de formación de metano son desnaturalizadas en presencia de oxígeno. También es posible encontrar organismos metanógenos en ambientes en los que se encuentran bacterias aerobias que crean microhábitats anoxigénicos que pueden aprovechar los organismos metanógenos (**Whitman et al., 2006**).

Las arqueas metanógenas son capaces de habitar una gran variedad de ambientes con rangos de temperatura muy amplios (Tabla 1). Los organismos metanógenos se pueden encontrar en ambientes muy diversos, desde muy fríos como la Antártida hasta los muy calientes (ej. manantiales hidrotermales, fuentes hidrotermales), en agua dulce (ej. lagos, ríos, etc.), en ambientes hipersalinos (ej. salmueras) que de manera natural tienen pH elevado (**Barber, 2007**); en campos de cultivo de arroz, humedales, pantanos, vertederos y en el tracto digestivo de termitas y rumiantes (**Thauer et al., 2008**). Sin embargo, todos comparten la característica de ser anaerobios estrictos y pertenecer al dominio Archaea, los cuales han sido clasificados en siete órdenes, tres phyla distintos (Tabla 1) y dos clases. Tres Órdenes pertenecen a los metanógenos clase I (*Methanobacteriales*, *Methanopyrales* y *Methanococcales*) y otros tres a los metanógenos clase II (*Methanomicrobiales*, *Methanocellales* y

Methanosarcinales) (Baptiste *et al.*, 2005; Borrel *et al.*, 2016). Mientras que el séptimo y último Orden propuesto, *Methanomassiliicoccales*, antes referido como *Methanoplasmatales* (Dridi *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2012) se ha colocado en la superclase Diaforarchaea (Petitjean *et al.*, 2015) y pertenece al orden Thermoplasmatales. Todos los organismos metanógenos pertenecen al phylum Euryarchaeota. También se han encontrado organismos pertenecientes a dos nuevos phyla, Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota, que potencialmente podrían llevar a cabo metanógenesis (Evans *et al.*, 2015; Vanwonterghem *et al.*, 2016).

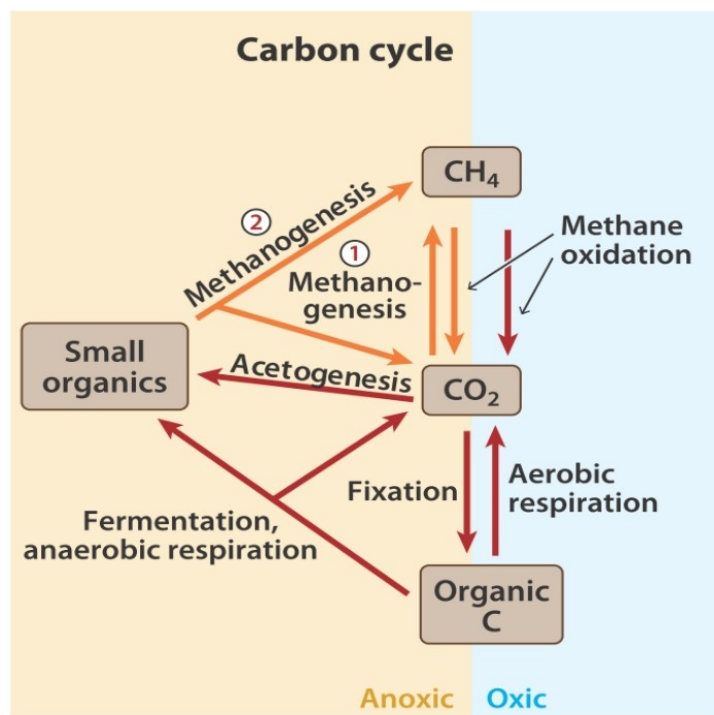


Figura 1. Ciclo del carbono, en donde se observa que el metano puede generarse en ambientes anoxigénicos, principalmente por la actividad de arqueas metanógenas que pueden estar asociadas a microorganismos aerobios, y rápidamente transformarse en dióxido de carbono (CO₂) en ambientes oxigénicos, por la actividad biológica de organismos metano oxidantes. Imagen tomada de **Offre *et al.*, 2013**.

IV.2 Evolución de la metanogénesis.

Se ha propuesto que la metanogénesis se originó en el periodo comprendido entre 3.8-4.1 mil millones de años, jugando un papel importante en el calentamiento de la Tierra primitiva (Battistuzzi *et al.*, 2004). Sin embargo, los primeros registros de la producción biológica de metano datan de hace 3.5-3.4 mil millones de años (Ueno *et al.*, 2006); y hasta el momento no tenemos evidencia más antigua que ésta en el registro fósil.

Hasta el año 2015, todos los organismos capaces de realizar metanogénesis eran ubicados en un solo phylum dentro del dominio Archaea, el phylum Euryarchaeota. Los análisis filogenéticos basados en secuencias de RNA ribosomal (rRNA) y enzimas clave para el proceso metanogénico (como la

metil CoM reductasa) no pudieron organizarlos en un solo grupo; proponiendo así dos clases (Clase I y Clase II) para tratar de explicar la historia evolutiva de dichos organismos (**Baptiste et al., 2005**). Por estas razones, se sugería que el metabolismo del metano había surgido tempranamente en la historia evolutiva, dentro del phylum Euryarchaeota (**Baptiste et al., 2005; Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006**), heredarse a las siguientes generaciones y perderse de manera independiente en varias ocasiones durante la historia evolutiva del phylum (**Borrel et al., 2013; Gao y Gupta, 2007; Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006**). No obstante, esta idea ha ido cambiando a lo largo del tiempo conforme se han realizado nuevos estudios.

Recientemente, Evans y colaboradores secuenciaron muestras ambientales y propusieron un nuevo phylum dentro del dominio Archaea ("*Candidatus Bathyarchaeota*") que contiene enzimas claves para el proceso metanogénico, por lo que éste es el primer reporte de un organismo que se encuentra fuera del phylum Euryarchaeota y que teóricamente puede realizar metanogénesis (**Evans et al., 2015**).

Posteriormente en 2016 se analizaron cinco genomas provenientes de muestras metagenómicas, los análisis filogenéticos llevaron a proponer el nuevo phylum "*Candidatus Verstraetearchaeota*" (**Vanwonterghem et al., 2016**) que fue colocado como grupo hermano de TACK, término que hace referencia a los phyla Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota y Korarchaeota (**Guy y Ettema, 2011**). Al igual que "*Candidatus Bathyarchaeota*", los organismos pertenecientes a "*Candidatus Verstraetearchaeota*" contienen enzimas claves para el proceso de metanogénesis basada en compuestos metilados, específicamente metabolizan metanol, metanotiol y metilamina (**Vanwonterghem et al., 2016**). Estos descubrimientos colocan a la metanogénesis fuera del phylum Euryarchaeota, en donde se pensaba que se había originado. Apoyando la hipótesis que propone que la metanogénesis pudo haber aparecido muy tempranamente en el ancestro de todo el dominio Archaea y posteriormente perderse en múltiples ocasiones en los diferentes linajes (**Borrel et al., 2016**).

Tabla 1. Phyla y Órdenes en los cuales se encuentran clasificados los organismos metanógenos. Se muestran, sus principales hábitats, el tipo de metanogénesis que llevan a cabo y el rango óptimo de temperatura a la que crecen estos microorganismos.

Phylum Orden	Hábitat	Tipo de metanogénesis	Rango óptimo de temperatura
Euryarchaeota <i>Methanobacteriales*</i>	-Sedimentos marinos y de agua dulce. -Suelos. -Tractos intestinales de animales. -Hábitats hidrotermales. -Digestores de aguas residuales. -Arrozales.	-Hidrogenotrófica -Metilotrófica.	-Entre 37 y 88 °C
Euryarchaeota <i>Methanopyrales*</i>	-Sedimentos marinos de origen hidrotermal.	-Hidrogenotrófica	-Entre 84 y 110 °C
Euryarchaeota <i>Methanococcales*</i>	-Sedimentos marinos. -Sedimentos marinos de origen hidrotermal.	-Hidrogenotrófica	-Entre 35 y 88 °C
Euryarchaeota <i>Methanomicrobiales**</i>	-Digestores anaerobios. -Aguas subterráneas. -Sedimentos marinos y de agua dulce. -Arrozales. -Campos petroleros. -Tractos intestinales de animales. -Aguas termales.	-Hidrogenotrófica	-Entre 15 y 57 °C
Euryarchaeota <i>Methanocellales**</i>	-Arrozales.	-Hidrogenotrófica	-Entre 35 y 37 °C
Euryarchaeota <i>Methanosarcinales**</i>	-Digestores anaerobios. -Sedimentos marinos y de agua dulce. -Tractos intestinales de animales. -Sedimentos hipersalinos.	-Hidrogenotrófica -Metilotrófica -Acetoclástica	-Entre 20 y 60 °C
Euryarchaeota <i>Methanomassilicoccales</i>	-Tractos intestinales de termitas y humanos	-Metilotrófica	-A 37 °C
Bathyarchaeota	-Muestras metagenómicas de agua marina.	-Metilotrófica	-?
Verstraetearchaeota	-Muestras metagenómicas de agua marina.	-Metilotrófica	-?

* Metanógenos de la clase I según la clasificación de **Bapteste et al., 2005**.

** Metanógenos clase II según la clasificación de **Bapteste et al., 2005**.

Nota: El Orden *Methanomassilicoccales* fue descrito (**Dridi et al., 2012; Paul et al., 2012**) y propuesto como un nuevo Orden de metanógenos (**Borrel et al., 2013**) después de que se realizó la clasificación de Bapteste y colaboradores, en su mayor parte la información presentada en esta tabla proviene de los trabajos de **Liu y Whitman 2008; Evans et al., 2015 y Vanwonterghem et al., 2016**.

Hasta ahora se sabe que solo organismos del dominio Archaea son capaces de realizar metanogénesis. Algunos autores proponen al metabolismo de metanogénesis, junto con el de acetogénesis, como los metabolismos más antiguos en la Tierra (**Martin y Russell, 2007; Sousa et al., 2013**). Se propone que ambos metabolismos surgieron en ambientes con temperaturas elevadas, como los que ofrecen los manantiales hidrotermales de las llamadas “white smokers” (**Martin y Russell, 2007**). Otras posturas más extremas ponen a la metanogénesis con fuertes implicaciones en el repertorio fisiológico del último ancestro común (LCA) (**Weiss et al., 2016**).

IV.3 Metabolismos autotróficos y metanogénesis

A nivel metabólico, una característica importante que comparten tanto las arqueas metanógenas como las bacterias homoacetogénicas, es la utilización de la ruta autotrófica de fijación de carbón Wood-Ljungdahl (WL), también conocida como ruta reductora de la acetil-CoA. Hasta el momento se conocen seis rutas autotróficas de fijación de carbono: 1) el ciclo reductor del ácido tricarbóxico (Arnon-Buchanan), 2) el biciclo del 3-hidroxiacetato, 3) el ciclo reductor de las pentosas fosfato (Calvin-Benson-Bassham), 4) la ruta reductora de la acetil-CoA (Wood-Ljungdahl), 5) el ciclo del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato y 6) el ciclo del dicarboxilato-4-hidroxiacetato (**Berg et al., 2010**). La ruta autotrófica de Wood-Ljungdahl es la única ruta que produce energía y fija carbón simultáneamente, ésta es aparentemente lineal, en lugar de una ruta autocatalítica (**Peretó 2012**); también es la única presente tanto en Bacteria como en Archaea (**Hügler y Sievert, 2011**). Debido a estas características, esta ruta ha sido propuesta como uno de los primeros metabolismos autotróficos en aparecer (**Berg et al., 2010; Fuchs 2011**).

Desde un punto de vista funcional, la ruta de WL puede ser separada en dos ramas, la llamada rama metilo (originalmente denominada “eastern”) y la rama carbonilo (originalmente llamada “western”) (**Wood et al., 1986**). La rama metilo es diferente en la acetogénesis y en la metanogénesis hidrogenotrófica, ya que varían en el número de enzimas que transfieren el grupo metilo, y por tanto en el número de reacciones. Adicionalmente, se sabe que las enzimas que participan en estas rutas no son homólogas, aún cuando se comparan a nivel de estructura terciaria (**Sousa et al., 2014**). Sin embargo, parece que la rama carbonilo es homóloga en ambos dominios y es en esta rama de la ruta en la que se forma acetil-CoA, por medio de la enzima bifuncional monóxido de carbono deshidrogenasa/ acetil-CoA sintasa (CODH/ACS); se ha sugerido que esta parte de la ruta pudo estar presente antes de la bifurcación de Bacteria y Archaea (**Berg et al., 2010**).

IV.4 Tipos de metanogénesis

IV.4.1 Metanogénesis Hidrogenotrófica

Este tipo de metanogénesis involucra siete pasos metabólicos (Figura 2A) en los que participan diferentes coenzimas, algunas fungiendo como acarreadoras de compuestos monocarbonados o compuestos C1 [ej. metanofurano (MFR), tetrahidrometanopterin (H₄MPT), factor III (que es un derivado de la vitamina B₁₂), coenzima F₄₃₀ y coenzima M) y otras descritas como acarreadoras de electrones (ej. coenzima F₄₂₀, coenzima F₄₃₀ y coenzima B (H-S-HTP)] (**Ferry 1993, Graham y White 2001**).

El primer paso metabólico de esta ruta consiste en la reducción de CO₂ a un grupo formilo y la posterior unión de este grupo formilo a la coenzima metanofurano (MFR). Dicha reducción se lleva a cabo con ayuda de dos electrones provenientes de la proteína ferredoxina (**Lessner 2009**). La reacción es catalizada por la enzima bifuncional formil-metanofurano deshidrogenasa (Fmd o Fwd, según contenga molibdeno o tungsteno) (EC 1.2.99.5), enzima multimérica conformada por seis subunidades (FmdA-F o FwdA-F) con dos isoenzimas, una con molibdeno (Fmd) y otra con tungsteno (Fwd) en el centro activo de la enzima. Se ha postulado que el uso de molibdeno o tungsteno está relacionado con la disponibilidad del metal en el medio, y por consiguiente, relacionado con el ambiente en el que crece el organismo que contenga dicha isoenzima (**Ferry 1999**). De las dos isoenzimas, sólo se tiene resuelta la estructura tridimensional de la que contiene molibdeno. Derivado de la resolución de la estructura se sabe que la enzima contiene 46 centros hierro-azufre [4Fe-4S], lo cual la convierte en una de las proteínas con más centros de este tipo (**Wagner et al., 2016**).

La segunda enzima, llamada formil-metanofurano tetrahidrometanopterin formiltransferasa (Ftr) (EC 2.3.1.101), cataliza la reacción reversible que produce formil-H₄MPT. En esta reacción se transfiere el grupo formilo de la coenzima MFR a la tetrahidrometanopterin (H₄MPT) (**Ferry 1999**). La enzima tiene sitios de unión específicos para la coenzima MFR y la H₄MPT. Se ha observado que el sitio activo de la Ftr se encuentra justo en el centro de estos dos sitios de unión, tal vez esto facilita el traspaso de la porción monocarbonada entre una coenzima y la otra (**Acharya et al., 2006**).

El tercer paso consiste en que el grupo formilo unido a la H₄MPT sea reducido a grupo metenil, esta reacción la realiza una ciclohidrolasa, la metenil-tetrahidrometanopterin ciclohidrolasa (Mch) (EC 3.5.4.27). A la fecha no se conocen los detalles específicos de esta reacción, debido a que no existe cristal disponible de la enzima con el sustrato (**Lessner, 2009**). Se ha encontrado a la enzima Mch en la bacteria *Methylobacterium extorquens*, y se ha observado que tiene una actividad cuatro veces mayor a la que exhibe la enzima análoga metenil tetrahidrofolato (H₄F) ciclohidrolasa (**Pomper et al., 1999**) que participa en homoacetogénesis.

La cuarta reacción es realizada por las enzimas formadoras de H₂ metileno-tetrahidrometanopterin deshidrogenasas. En esta reacción el grupo metenil unido a la H₄MPT es reducido a metileno. Dos distintas enzimas participan en esta reacción, una dependiente de H₂ (Hmd) (EC 1.12.98.2) y otra dependiente de la coenzima F₄₂₀ (Mtd) (EC 1.5.98.1) (**Ferry, 1999; Lessner, 2009**). Hmd es una enzima que tiene un centro de hierro mononuclear ([Fe]-deshidrogenasa), que parece ser una invención de algunos metanógenos hidrogenotróficos y una convergencia, al menos en función, con otras deshidrogenasas con centros metálicos dinucleares ([Fe-Fe] y [Fe-Ni] deshidrogenasas) (**Shima et al., 2008**). La otra deshidrogenasa, dependiente de coenzima F₄₂₀, usa F₄₂₀ + H₂ como donadores de electrones. Hasta ahora se conocen dos rutas alternativas para la reducción de F₄₂₀H₂, una en la que participan las enzimas Frc (deshidrogenasa reductora de F₄₂₀ que contiene cisteína) y Fru (deshidrogenasa reductora de F₄₂₀ que contiene selenocisteína) y otra en donde participan Hmd-Mtd. Aparentemente, la concentración de níquel en el medio es crucial para el uso de una u otra ruta (**Ferry, 1999**).

La quinta reacción es llevada a cabo por la enzima dependiente de F₄₂₀, la metileno-tetrahidrometanopterin reductasa (Mer) (EC 1.5.98.2). En esta reacción el grupo metileno unido a la H₄MPT es reducido a metilo (**Lessner, 2009**).

El sexto paso enzimático involucra la transferencia del grupo metilo unido a la H₄MPT. Éste primero es transferido al factor III y subsecuentemente a la coenzima M (CoM) (**Ferry, 1999**) por la metil-H₄MPT coenzima M metiltransferasa (Mtr) (EC 2.1.1.86). Este complejo enzimático se encuentra integrado en la membrana celular y es capaz de transferir el grupo metilo de un cofactor a otro, y a la vez transportar iones Na⁺ a través de la membrana, en una reacción dependiente de corrinoide, lo que genera un gradiente de sodio (Na⁺); dicho gradiente posteriormente será utilizado en la obtención de energía. Cabe destacar que esta metiltransferasa es diferente a las metiltransferasas utilizadas en la metanogénesis metilotrófica (**Becher et al., 1992**).

La enzima Mtr está compuesta por ocho subunidades (MtrA-H), de las cuales MtrA tiene el grupo prostético que es un corrinoide (una cobalamina), a este grupo prostético le es transferido el grupo metilo (**Gottschalk y Thauer, 2001**). MtrA no comparte el mismo sitio de unión a la cobalamina usual en otras enzimas con unión a B₁₂. Por comparaciones estructurales se sabe que MtrA está mayormente relacionada con enzimas funcionalmente distintas como la piruvato deshidrogenasa o la succinil CoA-sintasa (**Wagner et al., 2016**). La subunidad MtrH se encarga de mediar la transferencia del grupo metilo que está unido a la H₄MPT a la subunidad MtrA de la metiltransferasa, mientras que la subunidad MtrE cumple con dos funciones básicas, la de transferir el grupo metilo del grupo prostético corrinoide de MtrA a la coenzima M para formar metil-CoM; y posteriormente transportar los iones Na⁺ a través de la membrana. Se desconoce la función de las otras subunidades (MtrB, MtrC, MtrD, MtrF y MtrG) (**Gottschalk y Thauer, 2001**).

En el séptimo y último paso enzimático se produce metano y se activa una molécula de CO₂ (**Whitman et al., 2006**); ésta reacción la realiza la enzima metil coenzima M reductasa (Mcr) (EC 2.8.4.1). Dicha enzima es específica de todos los organismos capaces de producir metano, y por tanto, común a las tres variantes metabólicas de producción de metano (**Rospert et al., 1991**). Solo un grupo reducido de arqueas, específicamente pertenecientes a los phyla Euryarchaeota, Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota, tienen la enzima y la capacidad de producir metano. Algunos metanógenos contienen dos diferentes versiones de esta enzima, las isoenzimas Mcr I y Mcr II; ambas están constituidas por tres diferentes subunidades en una conformación $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. Las dos isoenzimas son muy parecidas entre sí, por lo que se presume que son homólogas, tal vez producto de una duplicación, a excepción de la subunidad gamma que tiene un tamaño distinto (**Rospert et al., 1990**). Además, ambas isoenzimas contienen dos moléculas de coenzima F₄₃₀ en su sitio activo, se ha propuesto que las concentraciones de H₂ y CO₂ son un factor determinante para la expresión de una u otra isoenzima (**Ferry 1999; Bonacker et al., 1993**). La estructura tridimensional de la enzima Mcr está compuesta por alfa hélices y se sabe que la formación de metano se da en un ambiente aromático hidrofóbico (**Ermler et al., 1997**). El mecanismo de esta reacción final involucra la reducción de la coenzima M (**Graham & White, 2001**). Dicha coenzima, con ayuda de la coenzima B, forma un heterodisulfuro, al formarse este heterodisulfuro se libera el metano (**Lessner 2009**). Finalmente el heterodisulfuro es reducido, por una heterodisulfuro reductasa y se restablece así la cantidad de coenzima M y coenzima B en la célula.

IV.4.2 Metanogénesis Acetoclástica

En esta variante de la metanogénesis se utiliza acetato como producto inicial, el cual es dividido en su porción de grupos metilo, carboxilo y Coenzima A (CoA). El grupo metilo es reducido hasta formar metano, mientras que el grupo carboxilo es oxidado a CO₂ y la CoA es reciclada (**Ferry, 1992**). Dentro de todos los organismos metanógenos, sólo hay descritos dos géneros capaces de realizar metanogénesis acetoclástica, los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta*. Debido a las características de las reacciones químicas que se llevan a cabo, este tipo de metanogénesis es considerada una fermentación verdadera (**Lessner, 2009**).

En organismos del género *Methanosarcina*, el primer paso metabólico consiste en la activación una molécula de acetil-CoA. La activación es llevada a cabo por la enzima acetato quinasa (Ack) (EC 2.7.2.1) que forma acetil-fosfato y adenosin difosfato (ADP) a partir de acetato y adenosin trifosfato (ATP); la segunda reacción la realiza la enzima fosfotransacetilasa (Pta) (2.3.1.8) que utiliza la acetil-fosfato y el ADP y produce acetil-CoA más ortofosfato (**Lessner, 2009**). El mecanismo de unión de la Ack por el acetato revela una interacción del grupo metilo del acetato con un hueco hidrofóbico de la Ack, mismo que juega un papel importante en la especificidad por el acetato y por la catálisis de esta

reacción (**Ingram-Smith et al., 2005**). En organismos pertenecientes al género *Methanosaeta* estas reacciones son llevadas a cabo por una sola enzima, la acetil-CoA sintasa formadora de AMP (ACS-AMP) (EC 6.2.1.1) (**Jetten et al., 1989**), la cual reemplaza la actividad de Ack y Pta.

Se ha propuesto que *Methanosaeta* es el género más importante en la producción de metano a través de esta variante de metanogénesis. Esta propuesta se basa en el hecho de que los miembros del género *Methanosarcina* realizan metanogénesis basada en compuestos metilados o vía metanogénesis hidrogenotrófica y no tanto metanogénesis acetoclástica, mientras que el género *Methanosaeta* tiene restringido su metabolismo al aprovechamiento de acetato (**Smith & Ingram-Smith, 2007**). Es bien sabido que *Methanosaeta thermophila* contiene cuatro genes que codifican para enzimas ACS AMP-dependientes y un gen que codifica para una enzima ACS ADP-dependiente. Hasta la fecha no se han encontrado secuencias homólogas a las enzimas ACS en especies del género *Methanosarcina* (**Berger et al., 2012**). En 2015 **Barnhart et al.** demostraron que las enzimas ACS dependientes de AMP (AMP-Acs), las ACS dependientes de ADP (ADP-Acs) y la acetato quinasa (Ack) comparten algunos motivos y características del sitio activo. El análisis filogenético también mostró una relación evolutiva, lo cual los llevó a proponer un modelo evolutivo que dio lugar al gen que codifica para la Ack, en este modelo se propone que el gen que codifica para la subunidad α de la ADP-Acs se duplicó y divergió, dando lugar al gen que codifica para Ack.

La siguiente reacción en la metanogénesis acetoclástica es llevada a cabo por la actividad bifuncional de la monóxido de carbono deshidrogenasa/Acetil-CoA sintasa (CODH/ACS) (**Ferry 1997**). Existen al menos cuatro clases de CODH/ACS descritas, mismas que participan en procesos anabólicos, catabólicos o una combinación de estos (anabólicos-catabólicos). Las enzimas clase I y clase II contienen cada una cinco subunidades ($\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$) y dos centros hierro-azufre (Fe_4S_4) en la subunidad α . Las CODH/ACS clase I son enzimas formadoras de acetil-CoA, mientras que las de clase II degradan acetil-CoA. Las de clase III están formadas por dos proteínas distintas, en una conformación de tetrámeros $\alpha_2\beta_2$ y heterodímeros $\gamma\delta$, en donde el tetrámero se encarga de la reducción de CO_2 a CO y de la formación de acetil-CoA, mientras que el heterodímero se encarga de la transferencia del grupo metilo entre el tetrámero $\alpha_2\beta_2$. Esta enzima tiene actividad tanto en catabolismo como en anabolismo. Finalmente, la CODH/ACS de clase IV está formada por monómeros de la subunidad α , misma que cataliza la oxidación de CO a CO_2 (**Lindahl y Chang, 2001**).

Siguiendo el esquema anteriormente descrito, la CODH/ACS que participa en la metanogénesis acetoclástica pertenece a la clase II y está compuesta por cinco subunidades, cada una con una actividad específica y por tanto con un número EC específico (CdhA EC 1.2.7.4, CdhB EC 1.2.7.4, CdhC EC 2.3.1.169, CdhD EC 2.1.1.245 y CdhE EC 2.1.1.245). La subunidad β (CdhC) se encarga de la activación de los enlaces C-C y C-S de la acetil-CoA; en organismos metanógenos esta subunidad contiene un centro metálico con un arreglo $\text{Ni}_2[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ (**Gencinc y Grahame, 2003; Lessner 2009**) en lugar de uno $\text{Cu-Ni}[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ que tiene la CODH/ACS de *Clostridium* (**Doukov et al.,**

2002). Las subunidades $\alpha\epsilon$ (CdhA y CdhB respectivamente) se encuentran en cercana interacción. Cada heterodímero contiene cuatro centros hierro-azufre Fe_4S_4 (denominados centros B, D, E y F), dos de los cuales (E y F) no se han observado en otras subunidades alfa de CODH/ACS's, ésta subunidad también contiene un centro Ni-Fe-S denominado centro C (**Lindahl y Chang, 2001; Gong et al., 2008**). La subunidad ϵ provee de algunos sitios de unión necesarios para la oxidación de CO mediada por FAD.

Se han propuesto dos distintas rutas para la transferencia de electrones a través de los centros hierro-azufre, una a través de los centros C, B y D que pudiera servir para la transferencia de los electrones desde y hacia el FAD, en el cual la subunidad ϵ pudiera estar participando y otro a través de los centros C, B, E y F que probablemente se usan para la transferencia de electrones desde y hacia la ferredoxina (**Gong et al., 2008**).

La subunidad γ (CdhE) contiene un centro Fe_4S_4 , similar a los centros B, D, E y F de la subunidad α , en esta subunidad el factor III y el grupo metilo unido al cofactor tetrahidrosarcinopterinina (H_4SPT) interactúan. Cabe destacar que la tetrahidrosarcinopterinina es un cofactor exclusivo del género *Methanosarcina* y éste difiere de la tetrahidrometanopterinina (H_4MPT) en un residuo glutamilo adicional (**van Beelen, 1984**) (Figura suplementaria 2). El grupo metilo proveniente de la acetil-CoA pasa a través de la subunidad γ de la CODH/ACS hacía la H_4SPT (**Lessner 2009**). La subunidad δ (CdhD) une cobalamina de forma no covalente (**Lindahl y Chang, 2001**). Las dos reacciones finales en la formación de metano a partir de acetato las lleva a cabo una metiltransferasa (Mtr) que transfiere el grupo metilo unido a la H_4SPT a la coenzima M, convirtiéndola en metil-CoM. Finalmente la metil-CoM reductasa (Mcr) reduce el grupo metilo a metano.

IV.4.3 Metanogénesis basada en compuestos metilados (metilotrónica)

Todas las rutas de producción de metano basadas en compuestos metilados (ej. metanol, metilaminas, dimetilsulfuro, etc.) tienen una manera similar de transferir un grupo metilo de un aceptor de electrones a la coenzima M. Este grupo metilo es transferido por complejos enzimáticos formados por tres diferentes polipéptidos, dos de los cuales tienen actividad de metil transferasa (denominados complejos MT1/MT2) y uno tiene la capacidad de unir un corrinóide como grupo prostético (denominado proteína corrinóide). En el paso final se reduce el grupo metilo de la coenzima M a metano por medio de la metil-CoM reductasa.

Metanol

La metanogénesis basada en metanol es llevada a cabo por el complejo polipeptídico específico MtaB, MtaC y MtaA. En este complejo solo MtaB (EC 2.1.1.90) y MtaA (EC 2.1.1.246) tienen actividad de metiltransferasa, mientras que MtaC es la proteína corrinóide (**Sauer et al., 1997**). MtaB cataliza la transferencia del grupo metilo del metanol al grupo prostético corrinóide de MtaC, posteriormente

MtaA transfiere el grupo metilo, que ahora está unido a MtaC, a la coenzima M (**Sauer y Thauer, 1999**).

Metilaminas (mono, di y trimetilamina)

Al igual que la metanogénesis basada en metanol, este tipo de metanogénesis es llevada a cabo por tres diferentes polipéptidos, que forman un complejo que transfiere el grupo metilo a la coenzima M, dos con actividad de metiltransferasa y uno con un corrinoide como grupo prostético. Las tres diferentes rutas basadas en metilaminas comparten la misma proteína MT2-A (MtbA) (EC 2.1.1.247), que tiene actividad de metiltransferasa y que se encarga de transferir el grupo metilo de la proteína corrinoide a la coenzima M (**Ferguson et al., 1996; Burke et al., 1998; Ferguson et al., 2000**).

En el caso de la monometilamina (MMA), el primer polipéptido que transfiere el grupo metilo de la monometilamina a la proteína corrinoide, es la MtmB (EC 2.1.1.248) (**Burke et al., 1995, Burke et al., 1997, Burke et al., 1998**). Cuando el sustrato inicial es dimetilamina, la primer reacción de transferencia del grupo metilo es llevada a cabo por la proteína MtbB1 (EC 2.1.1.249), que transfiere uno de los grupos metilos de la dimetilamina (DMA) a la proteína corrinoide MtbC (**Ferguson et al., 2000**). Para la trimetilamina, la proteína encargada de transferir el grupo metilo a la proteína corrinoide es la MttB (EC 2.1.1.250), la proteína corrinoide en este caso es la MttC (**Ferguson et al., 1997**).

Tioles metilados.

Para el dimetilsulfuro (DMS), el metanotiol (MeSH) y el metiltiopropionato, la proteína responsable de la transferencia del grupo metilo a la coenzima M es la metiltiol:coenzima M metiltransferasa (MtsA) (EC 2.1.1.251). Se ha propuesto que la proteína MtsB sirve como proteína corrinoide y a diferencia de la metanogénesis basada en metilaminas, que tienen complejos de dos metiltransferasas (en la forma MT1/MT2), la metanogénesis basada en tioles metilados solo tienen una proteína con actividad de metiltransferasa (**Tallant et al., 2001**). Por otro lado, cuando el sustrato es metilmercaptopropionato (MMPA) hay otro complejo enzimático formado por una metiltransferasa (MtpA) (EC 2.1.1.251) que realiza dos reacciones de transferencia del grupo metilo, primero del sustrato inicial a la proteína corrinoide MtpC y luego de la enzima corrinoide a la coenzima M (**Fu y Metcalf, 2015**).

V Justificación del trabajo

Los primeros reportes donde se describe la observación de gas metano datan del año 1776. En este año el investigador e inventor Alessandro Volta, en una carta entregada a su amigo el padre Carlo Campini, describe al metano como un “aire que arde con una hermosa flama azul”. Volta pensó en aprovechar la capacidad de combustión de este gas raro; sin embargo, tuvieron que pasar más de noventa años para que alguien más se interesara en las propiedades del metano. Béchamp un estudiante del instituto Pasteur en 1868 (**Ferry, 1993**) describe que el gas metano puede ser producido por microorganismos y no da más que una vaga descripción de estos. Más tarde Stephenson y Stickland en 1933 reportan el primer microorganismo aislado capaz de reducir compuestos monocarbonados hasta formar metano. Tres años después H. A. Baker comienza a dilucidar las bases fisiológicas del proceso metanogénico, que conforme pasaron los años fueron tomando forma con los ingeniosos experimentos de numerosos investigadores.

Hoy en día sabemos que el metano es un gas de efecto invernadero treinta veces más efectivo que el dióxido de carbono, por lo que su estudio es importante desde un punto de vista ambiental. También sabemos que puede ser utilizado como combustible para realizar diversos procesos industriales, por lo que se construyen bio-reactores con organismos con habilidades metanogénicas.

Así mismo tenemos conocimiento de que naturalmente existen al menos tres distintas variantes de este metabolismo, por lo que podemos pensar en explotar cualquiera de las variantes metabólicas. Sabemos que los organismos capaces de realizar metanogénesis solo pueden hacerlo en ambientes anoxigénicos y que este metabolismo está restringido a un grupo de organismos pertenecientes al dominio Archaea. Este metabolismo se ha vinculado con otras rutas de fijación de carbono, rutas autotróficas, y se ha propuesto como uno de los metabolismos más antiguos junto con el de la producción de acetato (específicamente la homoacetogénesis). Ello tiene fuertes implicaciones en el origen de la vida y en el último ancestro común; ambos temas distan bastante, tanto conceptualmente como en un contexto temporal. Sin embargo, el estudio de la metanogénesis puede abordarse desde diversos enfoques. Todavía falta mucho por saber sobre este metabolismo, que conforme han pasado los años ha ido tomando gran importancia a nivel fisiológico, ecológico e industrial. Para tener una idea de la importancia que ha ido tomando este campo de investigación a lo largo del tiempo, solo basta con ver el número de publicaciones por año, sobre temas relacionados con el metabolismo de la metanogénesis (Figura Suplementaria 1).

En este trabajo se intenta abordar el origen y la evolución de la metanogénesis y su relación con otros metabolismos autotróficos, entre ellos el ciclo de reducción de la acetil-CoA. Se trata de contestar preguntas relacionadas con las habilidades metabólicas que pudiera tener el último ancestro común.

VI Hipótesis

- ❖ El análisis evolutivo de las enzimas que participan en las distintas rutas de metanogénesis, nos permitirá dilucidar el posible origen y antigüedad relativa de este metabolismo, así como su relación con otras rutas de asimilación autotrófica de carbono.

VII Objetivo general:

- ❖ Conocer el posible origen y evolución del metabolismo de la metanogénesis y su relación con otras rutas metabólicas.

VII.1 Objetivos particulares:

- ❖ Identificar la distribución de las enzimas involucradas en los metabolismos de metanogénesis (hidrogenotrófica, acetoclástica y metilotrófica) mediante un análisis genómico.
- ❖ Inferir las relaciones evolutivas de dichas enzimas mediante la búsqueda intensiva de secuencias homólogas y análisis filogenéticos.

VIII Material y Métodos

Construcción de bases de datos locales:

En este trabajo se construyeron bases de datos locales con secuencias de proteomas completamente secuenciados de los dominios Archaea, Bacteria y Eukarya. Dichos proteomas fueron recuperados de la base de datos del KEGG (Kanehisa y Goto, 2000; Kanehisa *et al.*, 2014), con los genomas disponibles hasta el mes de septiembre de 2016. Las bases de datos fueron formateadas para las búsquedas por medio de BLST con la ayuda del algoritmo formatdb y con la opción -o T para de este modo “parsear” los identificadores y posteriormente poder recuperar las secuencias de las bases de datos.

Búsqueda de secuencias homólogas:

Búsqueda por medio de BLASTP y construcción de alineamientos:

Una vez construidas y formateadas las bases de datos locales, se realizó una búsqueda exhaustiva de secuencias homólogas para cada enzima que participa en las diferentes rutas de la metanogénesis, cuando se trataba de una enzima multimérica se buscó a cada una de las subunidades que la conforman, esta información fue recabada de los mapas de rutas metabólicas para la metanogénesis disponibles en la base de datos metacyc (Caspi *et al.*, 2014). Para la búsqueda de secuencias homólogas, primero se realizó una búsqueda utilizando la herramienta BLASTP versión 2.2.29+ (Altschul *et al.*, 1997), en donde se tomaron valores de corte para identidad (*identity*) y cobertura de la secuencia problema (*query coverage*) de 35% y 85% respectivamente, con una matriz de sustitución BLOSUM62. También se tomó en cuenta un valor de corte de E (e-value) menor de 1×10^{-6} teniendo siempre tamaños efectivos de la base de datos reales mayores a dos billones, esto con la finalidad de evitar la inclusión de secuencias que se parezcan solo por azar y que no tengan una relación evolutiva con las secuencias de estudio.

Las secuencias que pasaron los valores de corte en la búsqueda por medio de BLASTP, fueron recuperadas con ayuda de sus identificadores y el algoritmo fastacmd. posteriormente fueron alineadas con ayuda de MUSCLE versión 3.8.31 (Edgar, 2004) utilizando los valores predeterminados, lo que incluye un valor máximo de iteraciones igual a 16. Los alineamientos fueron revisados con ayuda del programa informático SeaView versión 4.0 (Galtier *et al.*, 1996).

Construcción de perfiles y búsqueda por medio de perfiles:

Una vez contruidos los primeros alineamientos se procedió a la construcción de perfiles de modelos ocultos de Markov (HMM por las siglas en inglés, Hidden Markov Models) con ayuda del programa HMMER versión 3.1b1 (mayo 2013) (**Finn et al., 2011**). Cada perfil resultante fue utilizado para llevar a cabo una búsqueda exhaustiva de las secuencias homólogas en nuestras bases de datos locales por medio de perfiles de HMMER, para los resultados se utilizaron los mismos valores de corte que para el BLASTP. Las secuencias resultantes de la búsqueda por medio de perfiles HMMER que pasaron los valores de corte fueron recuperadas de las bases de datos locales con ayuda de su identificador con el algoritmo fastacmd, una vez recabadas las secuencias también fueron alineadas con el programa MUSCLE, en este punto los alineamientos se revisaron uno por uno para tratar de encontrar incongruencias en los mismos utilizando SeaView. De manera automática se eliminaron las partes poco o nada informativas (partes pobremente alineadas y con grandes gaps) con ayuda del algoritmo trimAL versión 1.2rev59 (**Capella-Gutiérrez et al., 2009**), con la opción -automated1, misma que está optimizada para la construcción de filogenias por el método de máxima verosimilitud.

Selección de modelo de sustitución y análisis filogenético:

Antes de realizar el análisis filogenético se procedió a seleccionar un modelo evolutivo que se acoplara a cada uno de los alineamientos, con la finalidad de inferir de manera más precisa cada filogenia. La selección del modelo evolutivo, o modelo de sustitución, para cada conjunto de datos (Tabla Suplementaria 1) y la construcción de filogenias de máxima verosimilitud fueron realizadas de manera automática con el software IQ-TREE multicore versión 1.4.2 (**Nguyen et al., 2015**), en el caso de la selección del modelo evolutivo se indicó el parámetro -m TEST. Para cada filogenia se obtuvieron valores de soporte (bootstrap) de mil repeticiones utilizando la técnica de “*ultrafast bootstrap*” (**Minh et al., 2013**), para esto se utiliza la opción -bb 1000.

Visualización, anotación y generación de imágenes:

La visualización, anotación, y generación de imágenes de las filogenias se realizó con el software ItoI versión 3 (**Letunic y Bork, 2007**), disponible de manera gratuita y en línea en la siguiente dirección electrónica <http://itol.embl.de/>. Cabe destacar que gran parte de la anotación de las filogenias, sobre too la parte de los nombres se realizó de manera automática y desde antes de la construcción de los alineamientos con ayuda de programas informáticos desarrollados de manera exclusiva para este proyecto en lenguaje de programación Perl, con lo que se obtienen nombres de las ramas con la

especie a la que pertenecen las secuencias, en lugar de con los identificadores de las secuencias encontradas en las búsquedas exhaustivas de secuencias homólogas por medio de perfiles HMMER. Una vez anotadas las filogenias es posible generar imágenes desde el portal web de itol con la opción expot,

Construcción de la filogenia de SSU-RNA:

Además de las filogenias construidas para cada una de nuestras secuencias problema, también se construyó una filogenia de especies, utilizando las secuencias del RNA ribosomal de la subunidad pequeña (SSU-RNA). Para ello se tomaron como base los datos anteriormente publicados para la construcción del último árbol de la vida (**Hug L. et al., 2016**), en donde se incluyen las secuencias conocidas hasta mediados de 2016; esta filogenia también fue visualizada y anotada con el software Itol.

Heatmaps con base en las presencias-ausencias de las enzimas de la metanogénesis:

A partir de la información obtenida de las tablas de presencia y ausencia (Tablas 3, 6 y 8), se realizaron heatmaps con ayuda de un pequeño script en lenguaje de programación R versión 3.1.1, en el script se utilizaron las librerías pheatmap versión 1.0.8 y RcolorBrewer versión 1.1-2. Cada heatmap fue clusterizado con la finalidad de encontrar relaciones entre los organismos que contengan, o no, las enzimas en cuestión.

Script en R:

```
Heatmapstesis<-read.csv("para-heatmap.csv", head = TRUE, sep = ",")
str(Heatmapstesis)
nombres<-Heattesis[,1]
matrizHeattesis<-data.matrix(Heattesis[,2:ncol(Heattesis)])
rownames(matrizHeatmapstesis)<-nombres
library(pheatmap)
library(RColorBrewer)
pheatmap(matrizHeatmapstesis,
         col =coloresAzul, main = "Metanogénesis",
         cluster_rows = TRUE, cluster_cols = FALSE, fontsize_col = 8, fontsize_row = 8)
#Fin del script.
```

IX Resultados

En este trabajo se analizaron los aspectos evolutivos de cada una de las rutas de producción de metano, por lo que se estudió cada una de las enzimas que participan en las diferentes rutas. Para las enzimas multiméricas, se analizaron cada una de las subunidades que las componen. A continuación se detallarán los resultados derivados de este trabajo, para las enzimas Mtr compartida con la metanogénesis acetoclástica y la Mcr compartida con todas las rutas solo se describirán en el apartado de metanogénesis hidrogenotrófica.

IX.1 Metanogénesis hidrogenotrófica

La Tabla 2 y Figura 2A muestran los siete pasos involucrados en la reducción de CO₂ e hidrógeno a metano. En el caso de FmdA-F (Figuras 3 a 8), los resultados muestran que FmdA (Figura 3) y FmdF (Figura 8) tienen una amplia distribución que permite ubicarlas en los tres dominios de la vida (Tabla 3). Las demás subunidades, FmdB-E (Figuras 4 a 7), tienen una distribución confinada a Archaea y Bacteria (Tabla 3). Como se puede observar en la filogenia de SSU-RNA (Figura 25) no todas las subunidades de esta enzima están presentes en los organismos metanógenos, tal es el caso de Methanopyrales a los que les falta la subunidad FmdE (Tabla 4). Algunas arqueas no metanógenas tienen una o más subunidades de esta enzima, como Halobacteriales, Thermococcales y Thermoplasmatales, todos pertenecientes al phylum Euryarchaeota. Por otro lado, también organismos pertenecientes a los phyla Crenarchaeota, Lokirchaeota y Bathyarchaeota contienen una o más subunidades de la formil metanofurano-deshidrogenasa (Tabla 3).

Las enzimas formil metanofurano tetrahidrometanopterina formiltransferasa (Ftr) (Figura 9) y metenil-H₄MPT ciclohidrolasa (Mch) (Figura 10) son monoméricas y se observa que están ampliamente distribuidas en el dominio Bacteria. En el dominio Arquea se encuentran presentes en organismos metanógenos y en no metanógenos. Dentro de los no metanógenos, el phyla Korarchaeota solo tiene Ftr, Lokiarchaeota solo tiene Mch y Bathyarchaeota contiene ambas enzimas pero no realiza este tipo de metanogénesis (ver discusión). En el caso de Euryarchaeota tenemos a Archaeoglobales que tiene ambos pasos enzimáticos y Halobacteriales que solo tiene Mch. Todos los organismos metanógenos contienen ambos pasos enzimáticos (Figura 25 y Tabla 4). Las filogenias de ambas enzimas separan perfectamente a los organismos pertenecientes al dominio Archaea de las bacterias (Figuras 9 y 10).

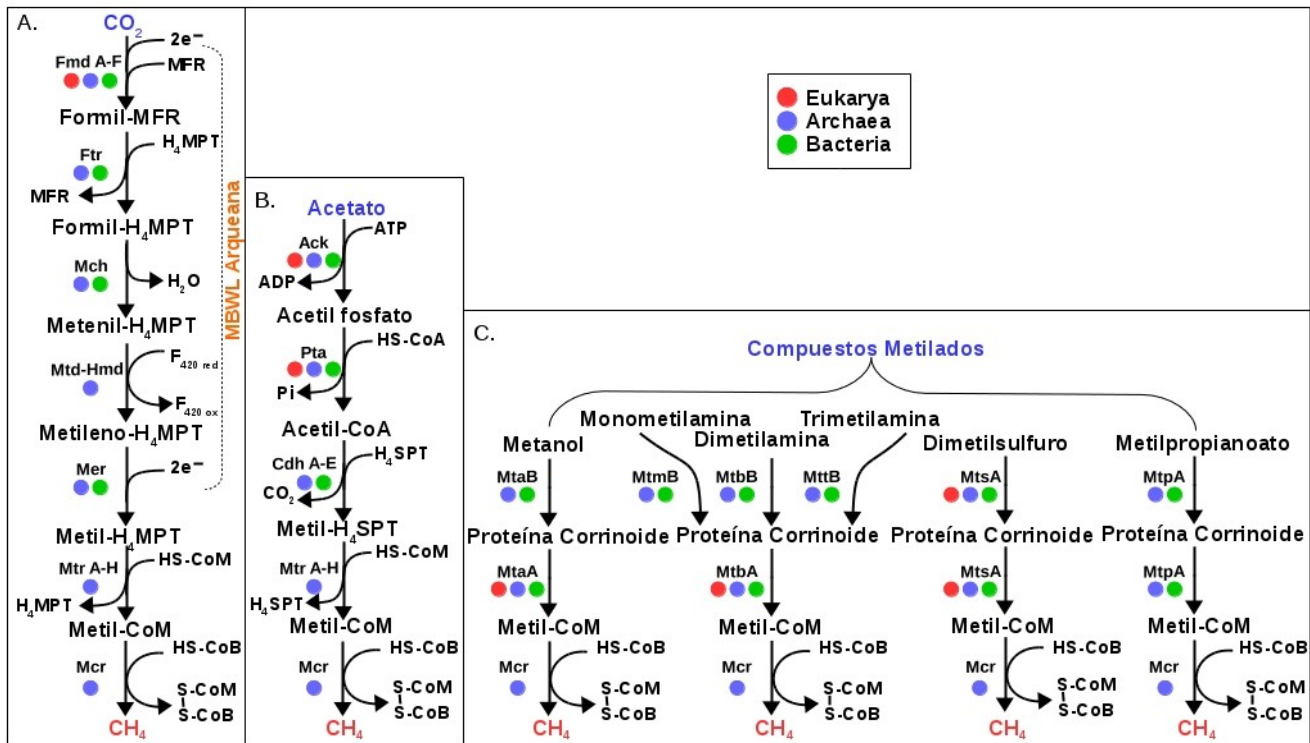


Figura 2. Variantes metabólicas de la producción de metano. Los círculos representan presencia y ausencia de las diferentes enzimas en los tres dominios (Eukarya en rojo, Archaea en azul y Bacteria en verde). A. Metanogénesis Hidrogenotrófica en la que los primeros cinco pasos metabólicos (de Fmd a Mer) comprenden la rama metilo del WL arqueano (Archaeal MBWL), la enzima Mtr está compartida con la metanogénesis acetoclástica y la Mcr con la metanogénesis Acetoclástica y metilotrófica. B. Metanogénesis Acetoclástica en la que los primeros dos pasos metabólicos varían según el organismo sea Methanosaeta o Methanosarcina. C. Metanogénesis metilotrófica, en este tipo de metanogénesis las metiltransferasas varían dependiendo el sustrato. Fmd Formil Metanofurano deshidrogenasa. Ftr Formil-metanofurano H_4MPT formiltransferasa. Mch Metenil H_4MPT ciclohidrolasa. Mtd-Hmd formadora de H_2 metileno- H_4MPT deshidrogenasa. Mer F_{420} -dependiente metileno- H_4MPT reductasa. Mtr Metil- H_4MPT coenzima M metiltransferasa. Mcr Metil-coenzima M reductasa. Ack Acetato Quinasa. Pta Fosfotransacetilasa. Cdh proteína del complejo enzimático Acetil-CoA descarboxilasa/sintasa. MtaB y MtaA metiltransferasas específicas para metanol, MtmB metiltransferasa específica de monometilamina. MtbB metiltransferasa específica de dimetilamina. MttB metiltransferasa específica de trimetilamina. MtbA metiltransferasa compartida entre todas las metilaminas. MtsA metiltransferasa específica de dimetilsulfuro. MtpA metiltransferasa específica de metilpropionato.

El siguiente paso es realizado por dos diferentes enzimas, una dependiente de H_2 , la enzima metileno- H_4MPT deshidrogenasa (Hmd), y la otra dependiente de coenzima F_{420} , la metileno- H_4MPT reductasa (Mtd), en el llamado ciclo Hmd-Mtd. Estas enzimas tienen una distribución restringida al dominio Archaea, a excepción de una bacteria, *Desulfurobacterium thermolithotrophum*, que aparece en la filogenia de Hmd (Figura 11). Entre las arqueas que contienen ambas enzimas se encuentran todas las que tienen capacidad de realizar metanogénesis y Archaeoglobales que no tiene la habilidad metabólica de la metanogénesis y que tiene solamente a Mtd en su genoma (Figura 25). La filogenia de Mtd (Figura 12) muestra a todos los Archaeoglobales (Archaeoglobus, Geoglobus y Ferroglobus) en una sola rama. En cuanto a las arqueas metanógenas, destacan los organismos

Tabla 2. Resumen de las enzimas que participan en la metanogénesis hidrogenotrófica. Se incluye nombre de la enzima, número de subunidades, número dado por la comisión enzimática (Enzyme Commission E.C.), genes que codifican para cada enzima o para cada subunidad y reacción.

Metanogénesis Hidrogenotrófica (H ₂ + CO ₂)				
Enzima	Nº de subunidades	Número E.C. Función enzimática	Genes	Reacción
1. Formil Metanofurano deshidrogenasa	3 a 6	1.2.99.5 Oxidoreductasa formilmetanofurano dehidrogenasa	<i>fmdA, fmdB, fmdC, fmdD fmdE and fmdF</i>	CO ₂ + metanofurano ⇌ formilmethanofurano. (Vorholt, J. A. y Thauer, R. K., 1997).
2. Formil Metanofurano:H ₄ MPT formiltransferasa	1	2.3.1.101 Transferasa Aciltransferasa	<i>ftr</i>	Formilmethanofurano + tetrahidromethanopterin + H ⁺ ⇌ metanofurano + 5-formil-tetrahidromethanopterin (Donnelly, M. I. y Wolfe, R. S., 1986).
3. Metenil-H ₄ MPT ciclohidrolasa	1	3.5.4.27 Hidrolasa	<i>mch</i>	5,10-meteniltetrahidromethanopterin + H ₂ O ⇌ 5-formil-tetrahidromethanopterin + H ⁺ (Donnelly, et al., 1985).
4. Metileno-H ₄ MPT deshidrogenasa formadora de H ₂	1	1.12.98.1 Oxidoreductasa	<i>mtd-hmd</i>	5,10-meteniltetrahidromethanopterin + H ₂ ⇌ 5,10-metileno-tetrahidromethanopterin + H ⁺ (Klein, et al., 1995).
5. Metileno-H ₄ MPT reductasa Dependiente de F ₄₂₀	1	1.5.98.2 Oxidoreductasa	<i>mer</i>	Convierte la coenzima oxidada F ₄₂₀ + N5-metiltetrahidromethanopterin ⇌ coenzima F ₄₂₀ reducida + 5,10-metileno-tetrahidromethanopterin (te Brömmelstroet, et al., 1990).
6. Metil-H ₄ MPT:coenzima M metiltransferasa	8	2.1.1.86 Transferasa Metiltransferasa	<i>mtrA, mtrB, mtrC, mtrD, mtrE, mtrF, mtrG and mtrH</i>	2 Na ⁺ + N5-metiltetrahidromethanopterin + coenzima M ⇌ 2 Na ⁺ + tetrahidromethanopterin + metil-CoM (Gärtner, et al., 1993).
7. Metil-coenzima M reductasa	3	2.8.4.1 Transferasa coenzima-B sulfoetiltransferasa	<i>McrA, mcrB y mcrG</i> (metil-coenzima M reductasa I)	Coenzima B + metil-CoM ⇌ CoB-CoM heterodisulfuro + metano (Scheller, et al., 2010).

pertenecientes a los géneros Methanocellales y Methanosarcinales, ya que ambos carecen de Hmd (Tabla 4).

El quinto paso metabólico lo realiza la enzima metileno-H₄MPT reductasa dependiente del cofactor F₄₂₀ (Mer), que en nuestros resultados muestra una distribución amplia en Bacteria, mientras que en

Archaea la enzima está restringida a los phyla Euryarchaeota, Thaumarchaeota y Bathyarchaeota (Tabla 3). Dentro de Euryarchaeota Mer se encuentra ausente en Methanobacteriales, Methanopyrales, Thermococcales y Thermoplasmatales (Tabla 4). Nuestro análisis filogenético sugiere una estrecha relación evolutiva entre la enzima de arqueas y la de bacterias del phylum Actinobacteria (Figura 13). La sexta enzima, la metil-H4MPT coenzima M metiltransferasa está compuesta por ocho subunidades, siete de ellas (MtrA-G) (Figuras 14 a 20) se encuentran presentes sólo en el dominio Archaea. Las subunidades MtrB-G están confinadas específicamente al phylum Euryarchaeota (Figuras 15 a 20), mientras que MtrA además de estar presente en Euryarchaeota también se encuentra en el phylum Thaumarchaeota (Figura 14). La subunidad MtrH se encuentra ampliamente distribuida en Archaea, con presencia en Lokiarchaeota, Bathyarchaeota, Crenarchaeota y Korarchaeota y en algunas bacterias pertenecientes a Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, y Firmicutes-Clostridia, así como en organismos pertenecientes a Euryarchaeota sin capacidad de producir metano, tal es el caso de Archaeoglobus, Ferroplasma y Geoglobus todos pertenecientes al orden Archaeoglobales (Figura 21).

La última enzima, común a todas las rutas metabólicas de producción biológica de metano es la metilcoenzima M reductasa. Esta enzima tiene tres subunidades (McrA, McrB y McrG), todas las subunidades tienen una distribución restringida al dominio Archaea y están presentes en los phyla Euryarchaeota, Bathyarchaeota (Figuras 22 a 24), así como en el phylum recientemente descrito Verstraetearchaeota. En este análisis no se muestran datos de Verstraetearchaeota debido a la disponibilidad de los genomas en el KEGG a la fecha de la construcción de las bases de datos locales. En las filogenias de cada una de las subunidades de esta enzima (Figuras 22 a 24) se puede observar que las secuencias pertenecientes a los organismos del phylum Bathyarchaeota son muy divergentes con respecto al resto de organismos.

Todas las presencias y ausencias de las enzimas, o en su defecto subunidades que participan en la metanogénesis hidrogenotrófica se encuentran resumidas en la Tabla 3; mientras que en la Figura 25 se puede observar la amplia distribución de los primeros cinco pasos metabólicos de esta ruta, que también corresponden a la rama metilo del metabolismo de reducción de la acetil-CoA o Wood-Ljungdahl (WL). Dicha distribución podría tener implicaciones en las capacidades metabólicas del último ancestro común, del ancestro del dominio Archaea y específicamente en las del ancestro de Euryarchaeota (ver discusión). Finalmente, el sexto y séptimo pasos metabólicos solo se encuentran en los phyla Euryarchaeota y Bathyarchaeota.

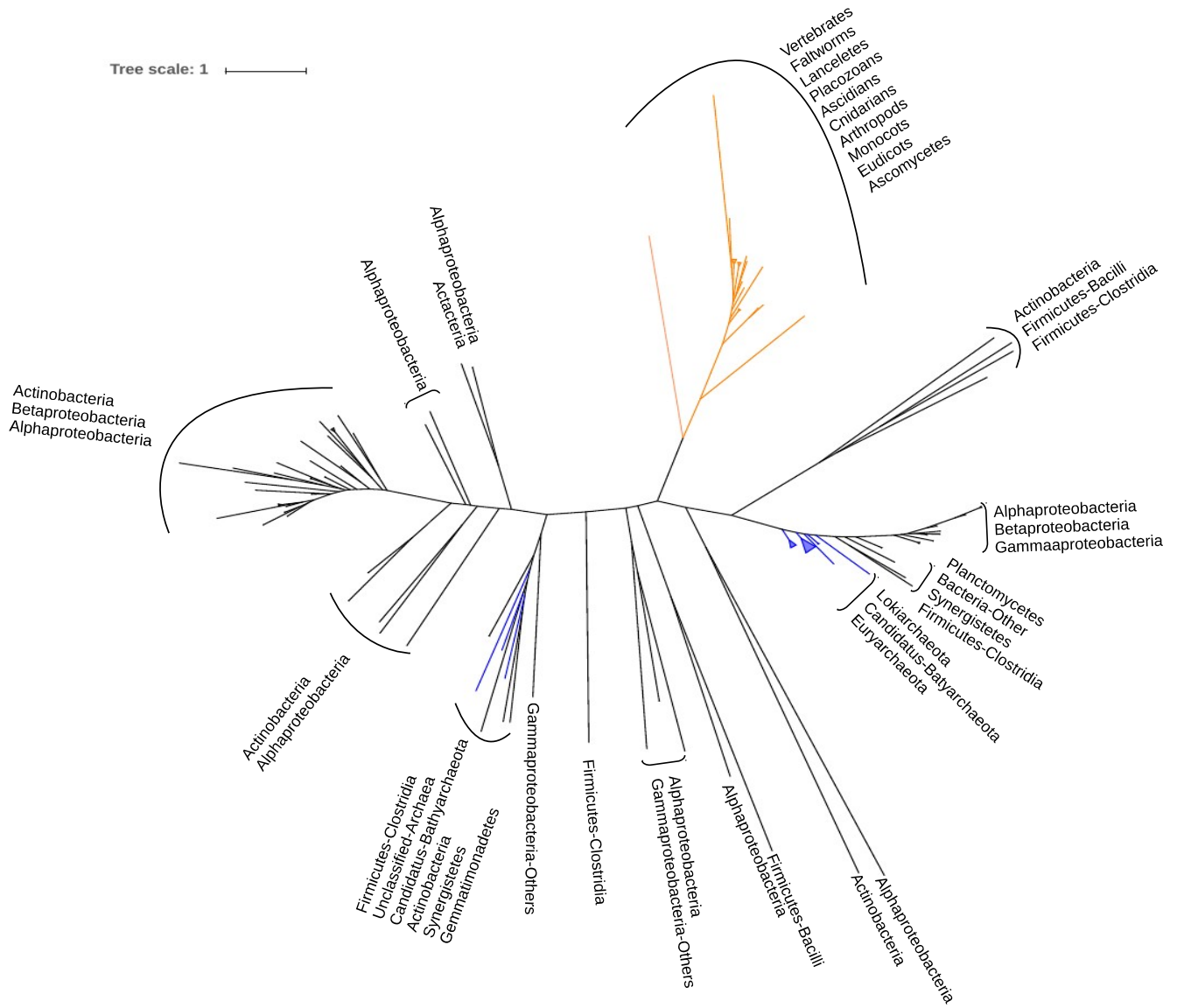


Figura 3. Filogenia de la subunidad A de la proteína Formil Metanofurano deshidrogenasa (FmdA). Las ramas en color anaranjado representan los linajes Eucariontes, en negro las bacterias y en azul las arqueas.

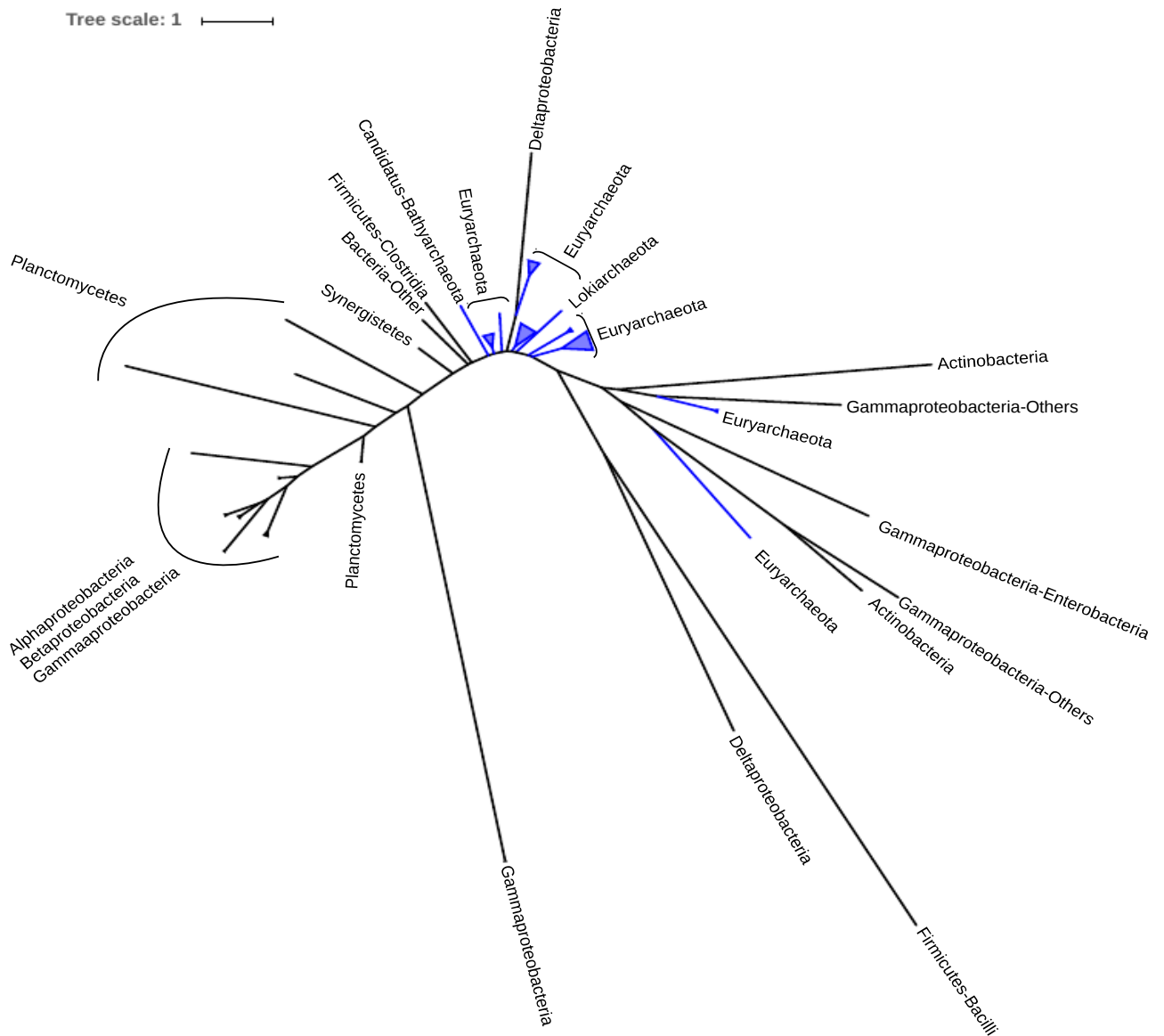


Figura 4. Filogenia de la Formil Metanofurano deshidrogenasa subunidad B (FmdB). En azul se encuentran coloreadas las ramas de los organismos pertenecientes al dominio Archaea y en negro las de los organismos pertenecientes a Bacteria.

Tree scale: 1

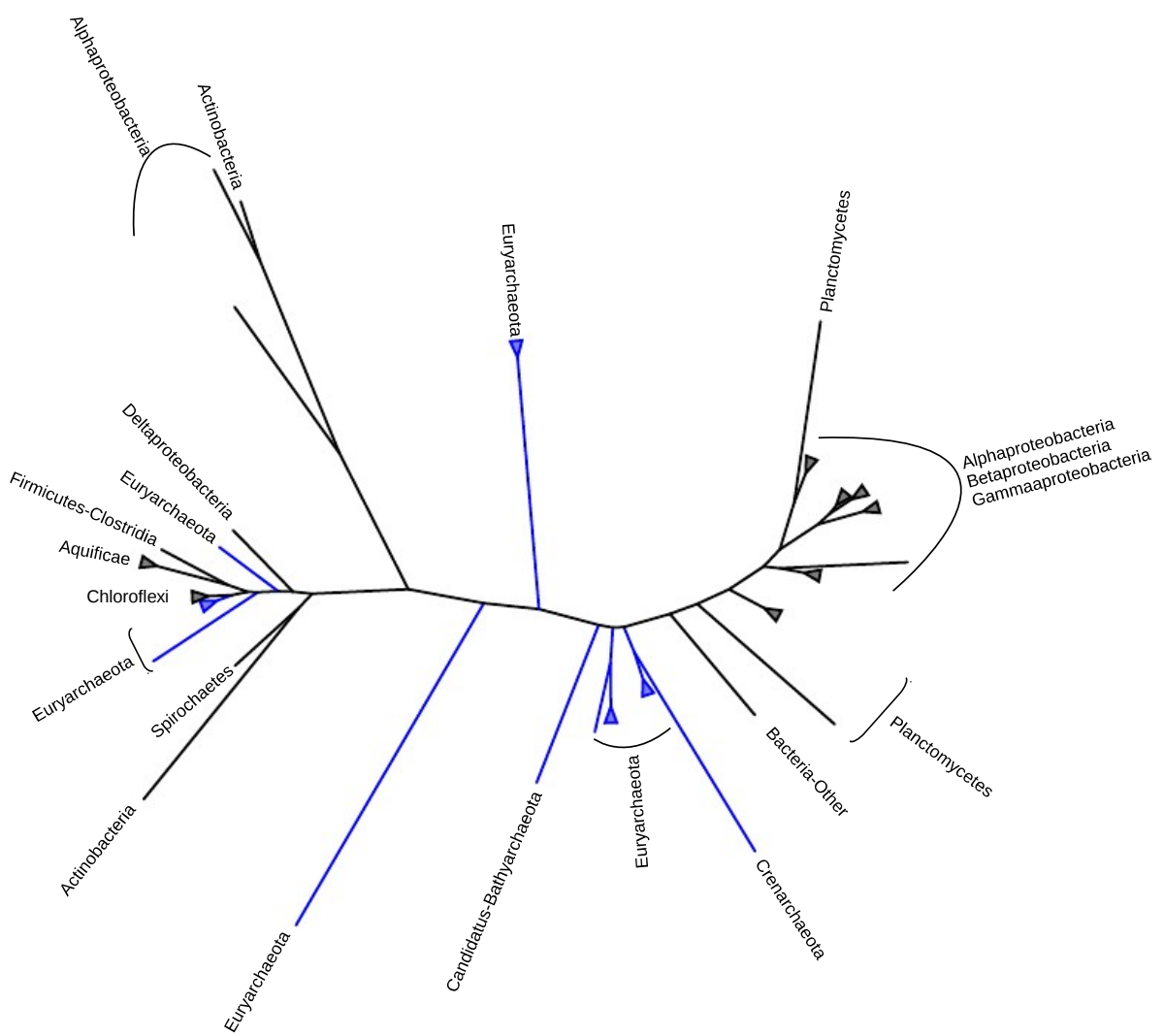


Figura 5. Filogenia de la subunidad C de la proteína Formil Metanofurano deshidrogenasa (FmdC). Se puede apreciar en color azul a las ramas de los organismos que pertenecen al dominio Archaea y en negro a las ramas de organismos del dominio Bacteria.

Tree scale: 1

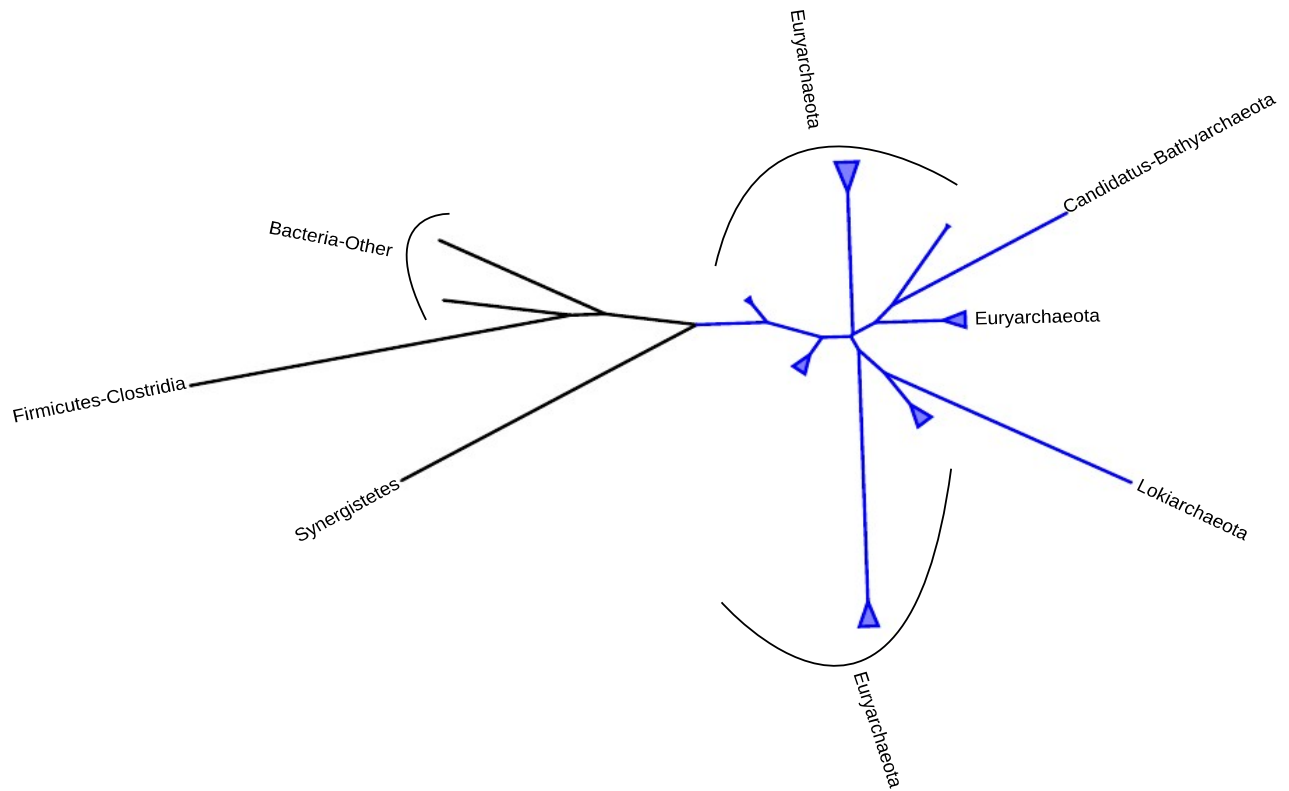


Figura 6. Filogenia de la Formil Metanofurano deshidrogenasa subunidad D (FmdD). Se forman dos grupos distintos, del lado derecho y en color azul se encuentran las ramas de los organismos pertenecientes al dominio Archaea, mientras que del lado izquierdo y en color negro las ramas de los organismos pertenecientes al dominio Bacteria.

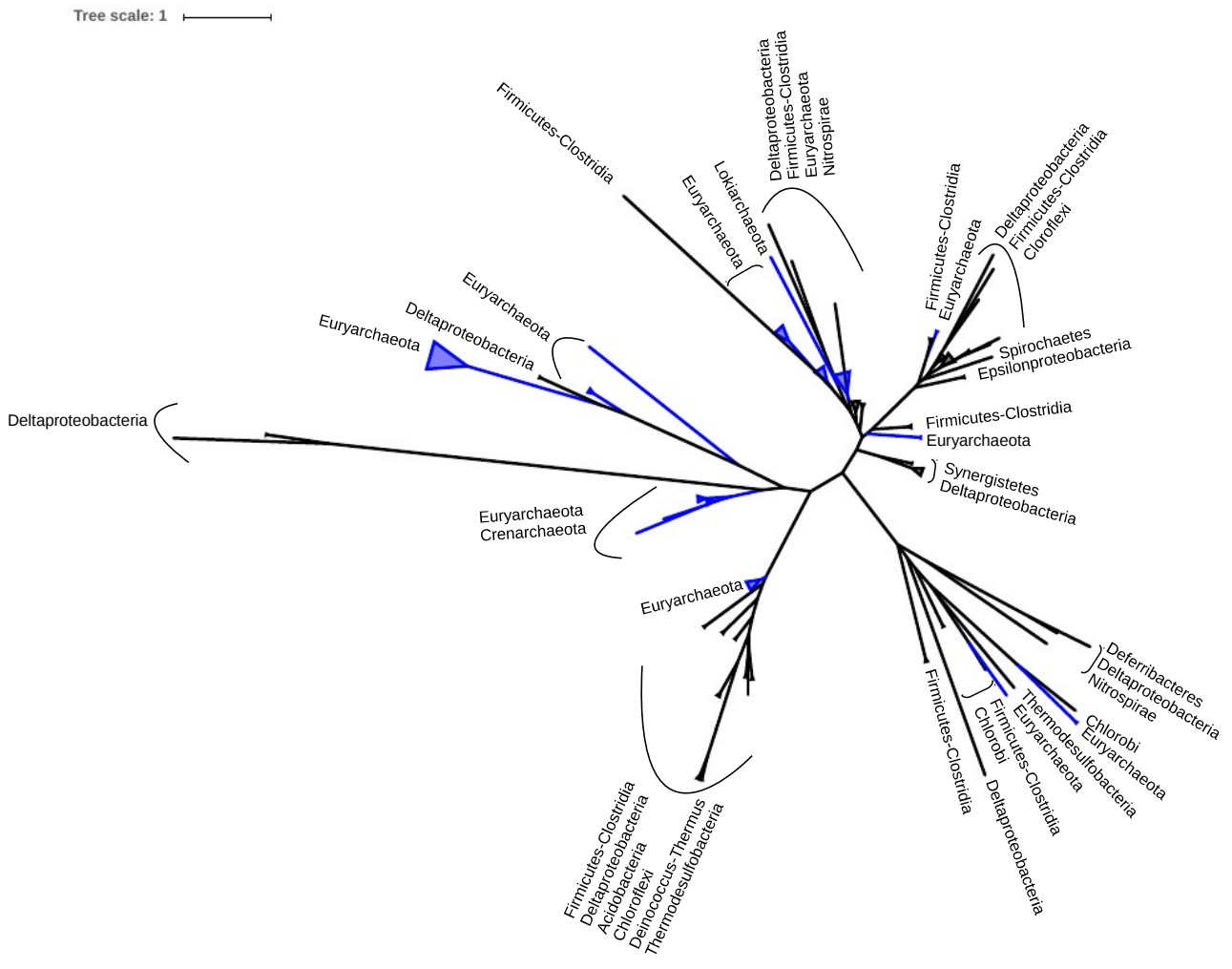


Figura 7. Filogenia de la subunidad E de la enzima Formil Metanofurano deshidrogenasa (FmdE). Se muestran en color azul a las ramas de organismos pertenecientes al dominio Arquea y en color negro las ramas pertenecientes a organismos del dominio Bacterias.

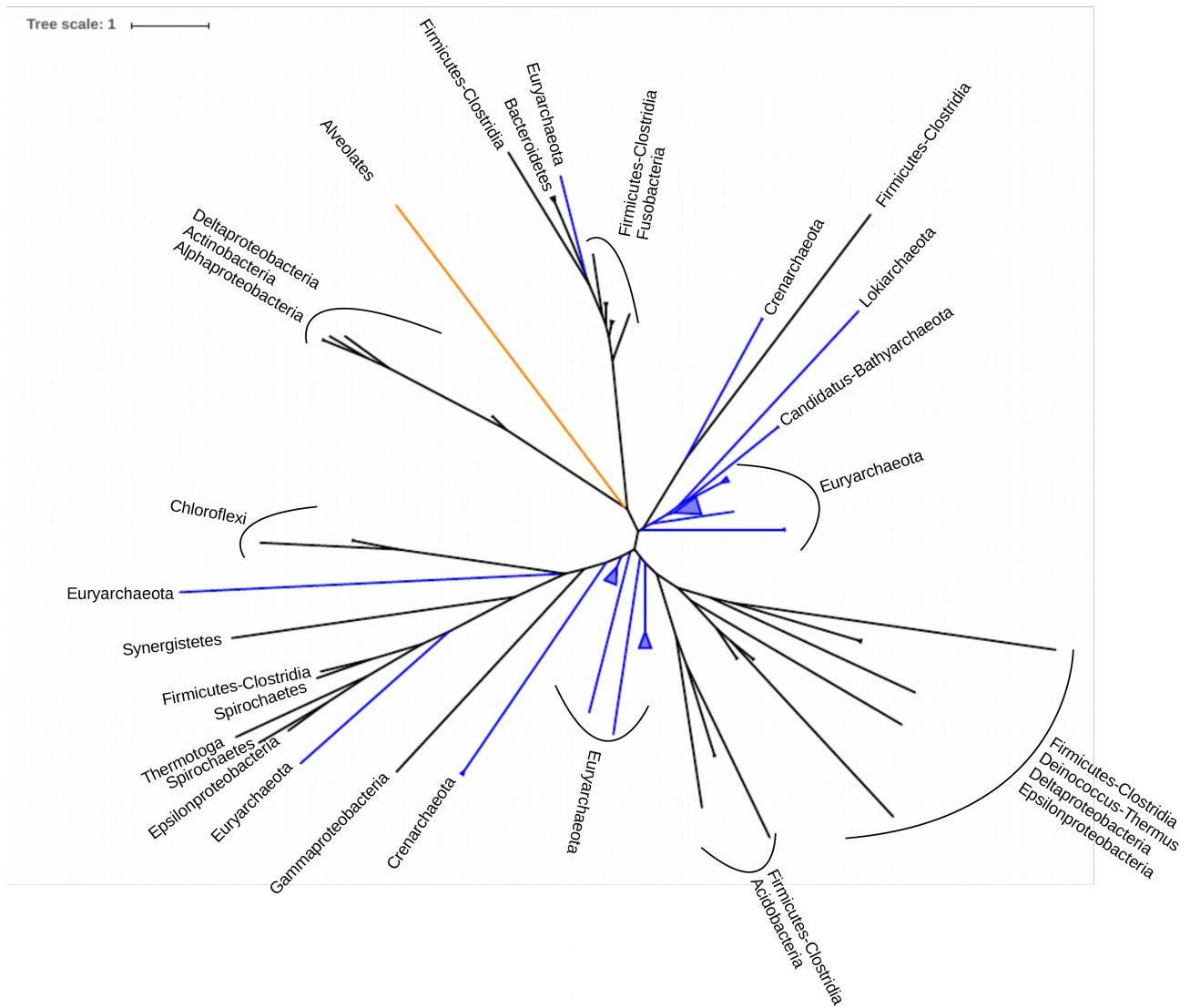


Figura 8. Filogenia de la subunidad F de la proteína Formil Metanofurano deshidrogenasa (FmdF). En ella se puede observar en color anaranjado la rama de un organismos perteneciente al dominio Eucaria, las ramas en color negro pertenecen a organismos del dominio Bacteria y en color azul las ramas de organismos del dominio Arquea.

Tabla 4. Presencia (cuadros amarillos) y ausencia (cuadros vacíos) de las proteínas, o subunidades de estas, que participan en la metanogénesis hidrogenotrófica. Esta tabla representa a mayor detalle los órdenes del phylum Euryarchaeota y es complementaria a la Tabla 3.

Enzima Número EC	Metanogénesis Hidrogenotrófica																						
	1. Formylmethanofuran dehydrogenase 1.2.99.5						2. Formylmethanofuran:H ₄ MPT formyltransferase 2.3.1.101	3. Methenyl-H ₄ MPT cyclohydrolase 3.5.4.27	4. H ₂ -forming methylene-H ₄ MPT dehydrogenase 1.12.98.2			5. F ₄₂₀ -dependent methylene-H ₄ MPT reductase 1.5.98.2	6. Methyl-H ₄ MPT:coenzyme M methyltransferase 2.1.1.86						7. Methyl-coenzyme M reductase 2.8.4.1				
Gen	fmdA	fmdB	fmdC	fmdD	fmdE	fmdF	fr	mch	mtd	hmd	mer	mtrA	mtrB	mtrC	mtrD	mtrE	mtrF	mtrG	mtrH	mcrA	mcrB	mcrG	
Archaeoglobales																							
Halobacteriales																							
Methanobacteriales																							
Methanocellales																							
Methanococcales																							
Methanomicrobiales																							
Methanopyrales																							
Methanosarcinales																							
Thermococcales																							
Thermoplasmatales																							

Tree scale: 1

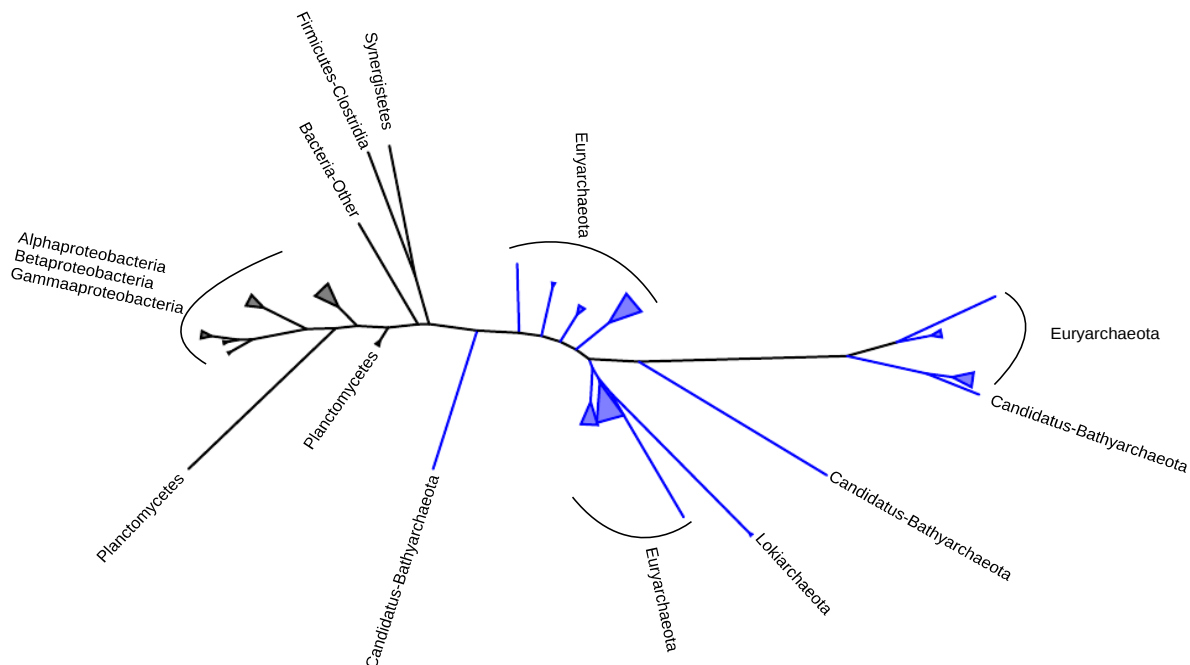


Figura 9. Filogenia de la enzima Formil-metanofurano H₄MPT formiltransferasa (Ftr). Se puede apreciar dos grupos bien separados, del lado derecho todas las arqueas en color azul y del lado izquierdo a las bacterias en color negro; entre las arqueas es posible observar a Lokiarchaeota en una rama junto con organismos pertenecientes a Euryarchaeota.

Tree scale: 1

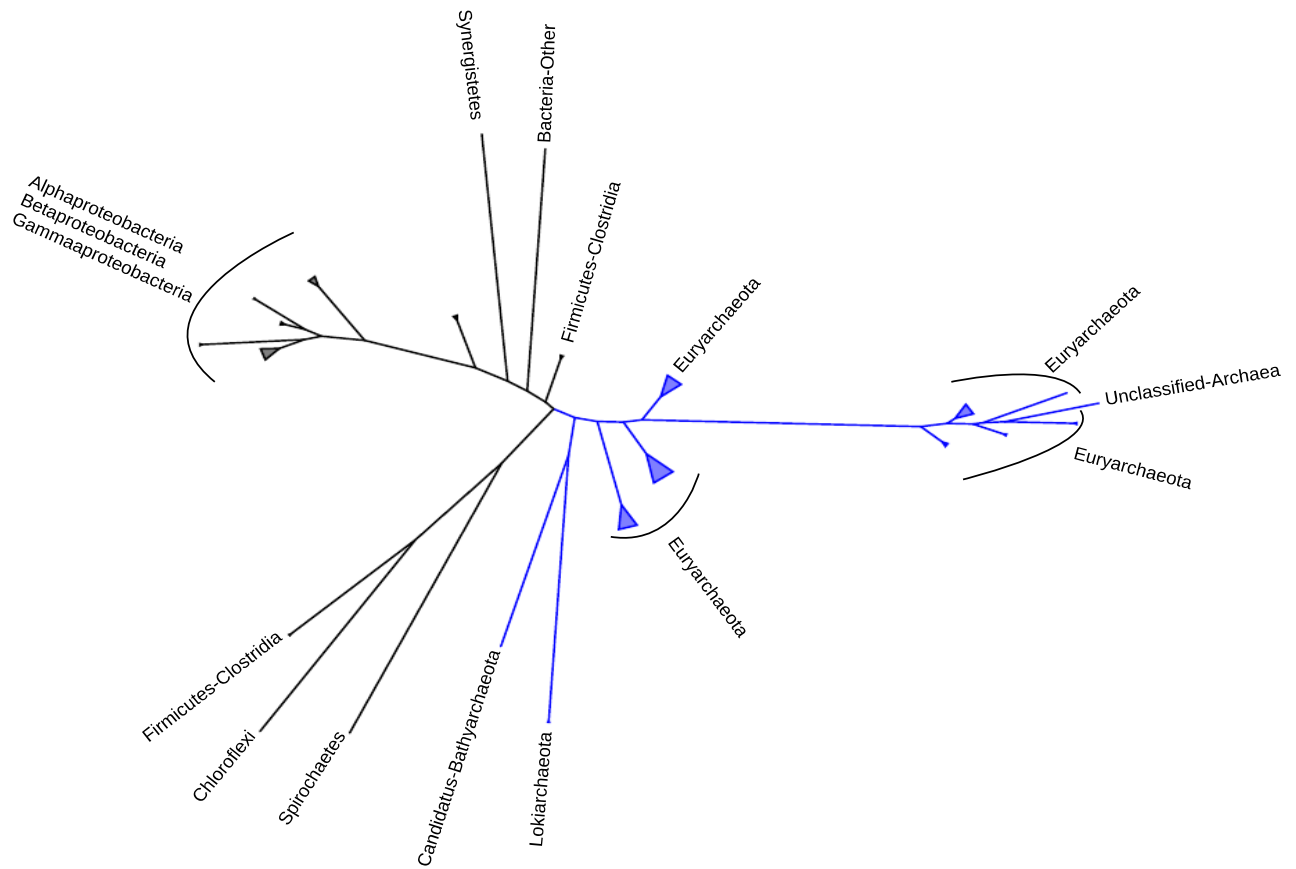


Figura 10. Filogenia de la enzima Metenil H₄MPT ciclohidrolasa (Mch), en donde es posible apreciar del lado derecho y en color azul a todas las arqueas, en donde destaca la agrupación de Bathyarchaeota con Lokiarchaeota; mientras que del lado derecho y en color negro, es posible observar a todas las bacterias.

Tree scale: 1

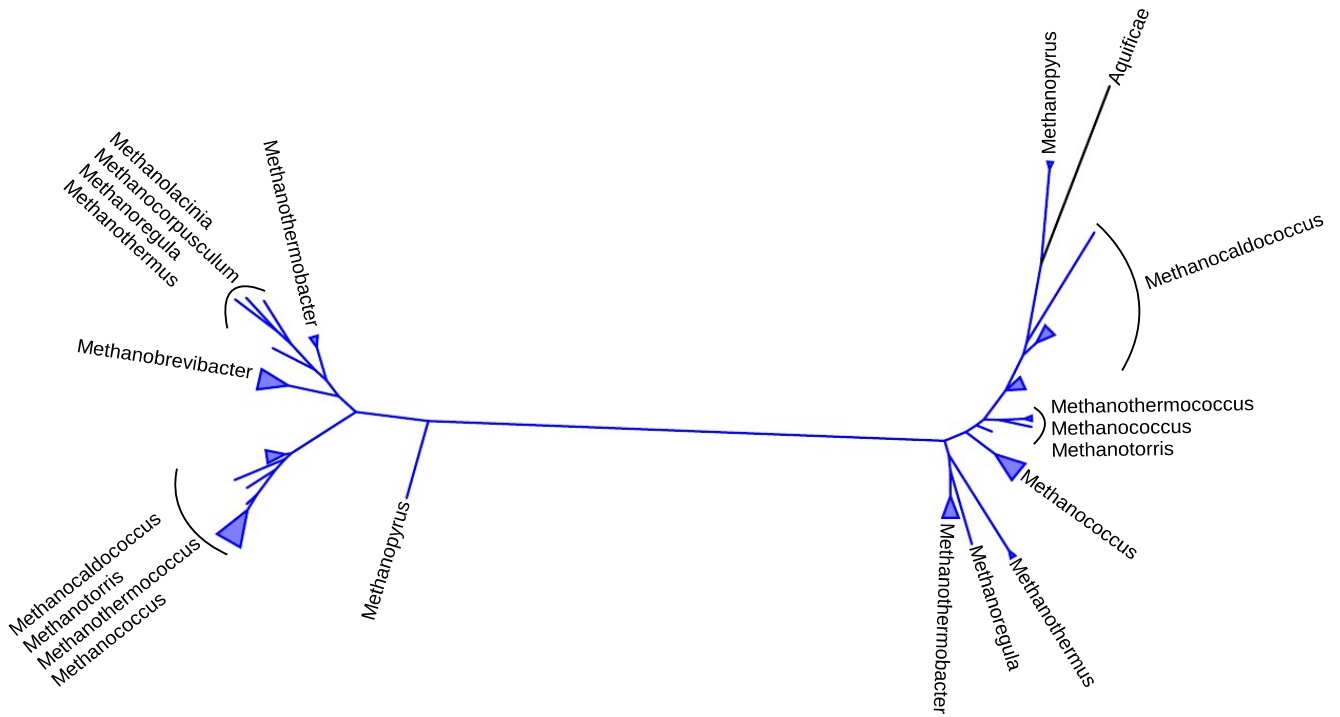


Figura 11. Filogenia de la enzima formadora de H₂ metilene-H4MPT deshidrogenasa (Hmd), en la que se puede observar que se forman dos grupos de arqueas, todas pertenecientes a Euryarchaeota; del lado derecho junto a la rama que pertenece a Methanopyrales se puede observar una rama que pertenece a una bacteria del phylum Aquificae.

Tree scale: 1

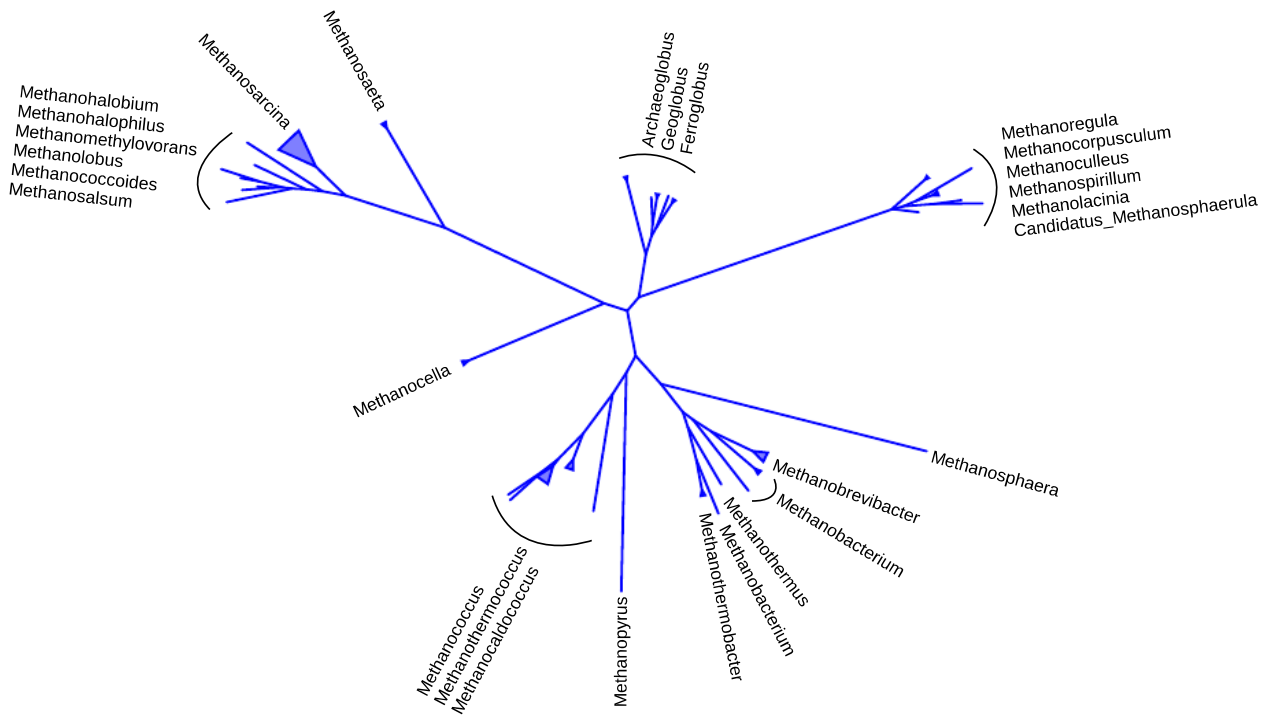


Figura 12. Filogenia de la enzima formadora de H₂ metileno-H4MPT deshidrogenasa (Mtd), en donde solo se observan arqueas, todas pertenecientes al phylum Euryarchaeota, a excepción de las Archaeoglobales (lo que incluye a Archaeoglobus, Geoglobus y Ferroglobus), todas las demás realizan metanogénesis.

Tree scale: 1

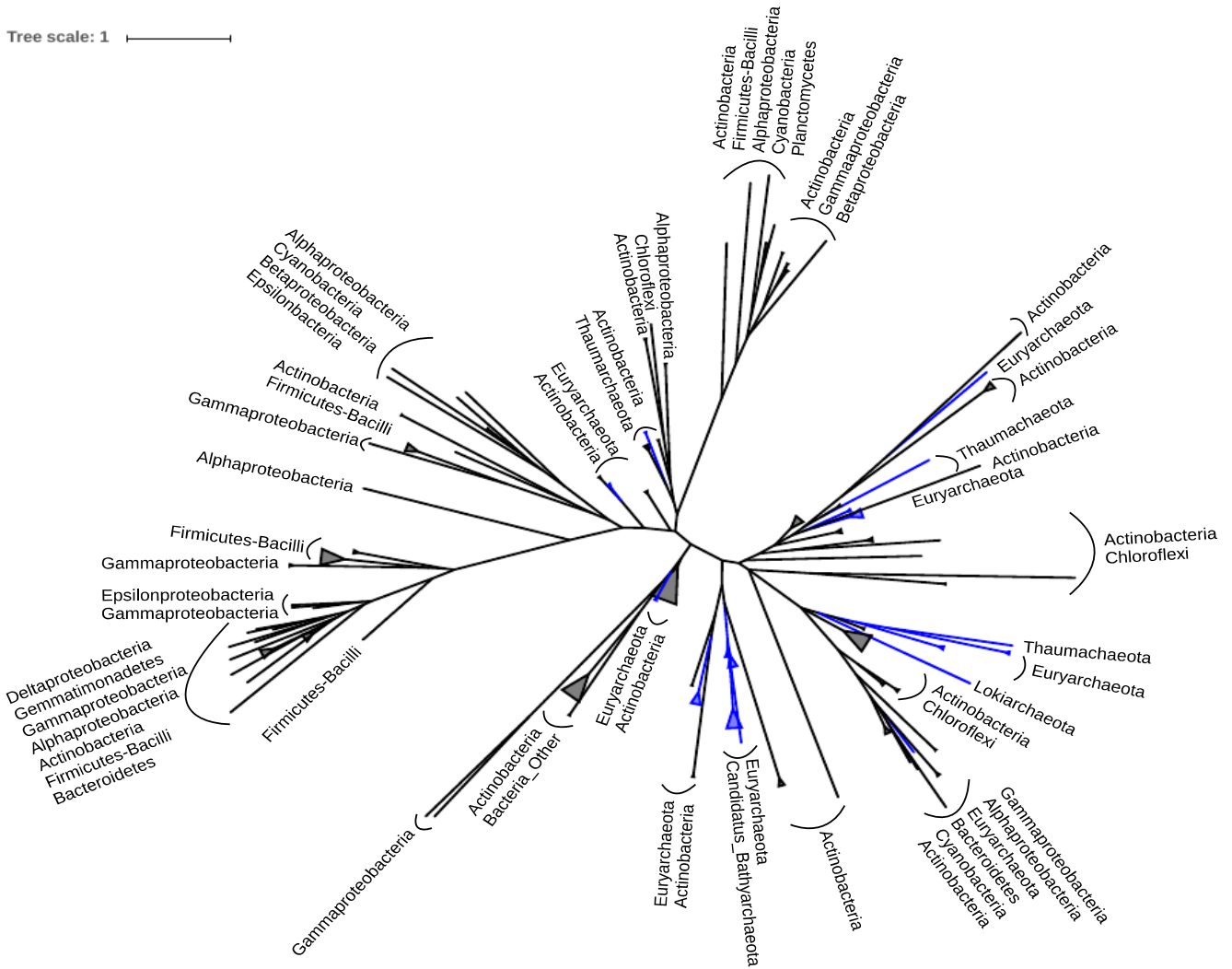


Figura 13. Distribución filogenética de la enzima F₄₂₀-dependiente metileno-H₄MPT reductasa (Mer), las ramas en color negro representan linajes bacterianos, mientras que las ramas en color azul representan organismos pertenecientes al dominio Archaea.

Tree scale: 1

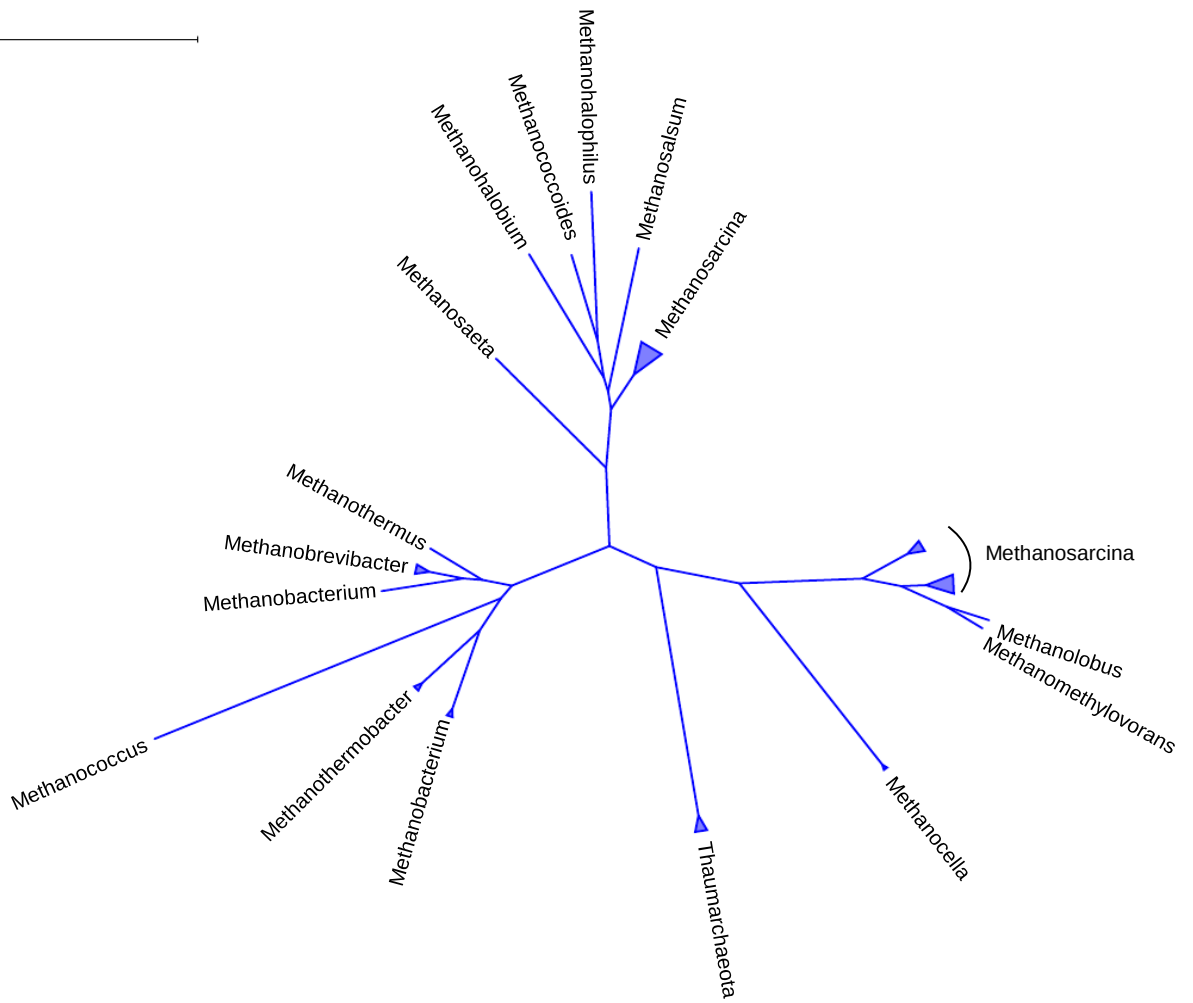


Figura 14. Filogenia de la subunidad A de la enzima Metil- H_4 MPT coenzima M metiltransferasa (MtrA). Se observa a un organismo del phylum Thaumarchaeota entre todas las arqueas metanógenas que aparecen en esta representación.

Tree scale: 1

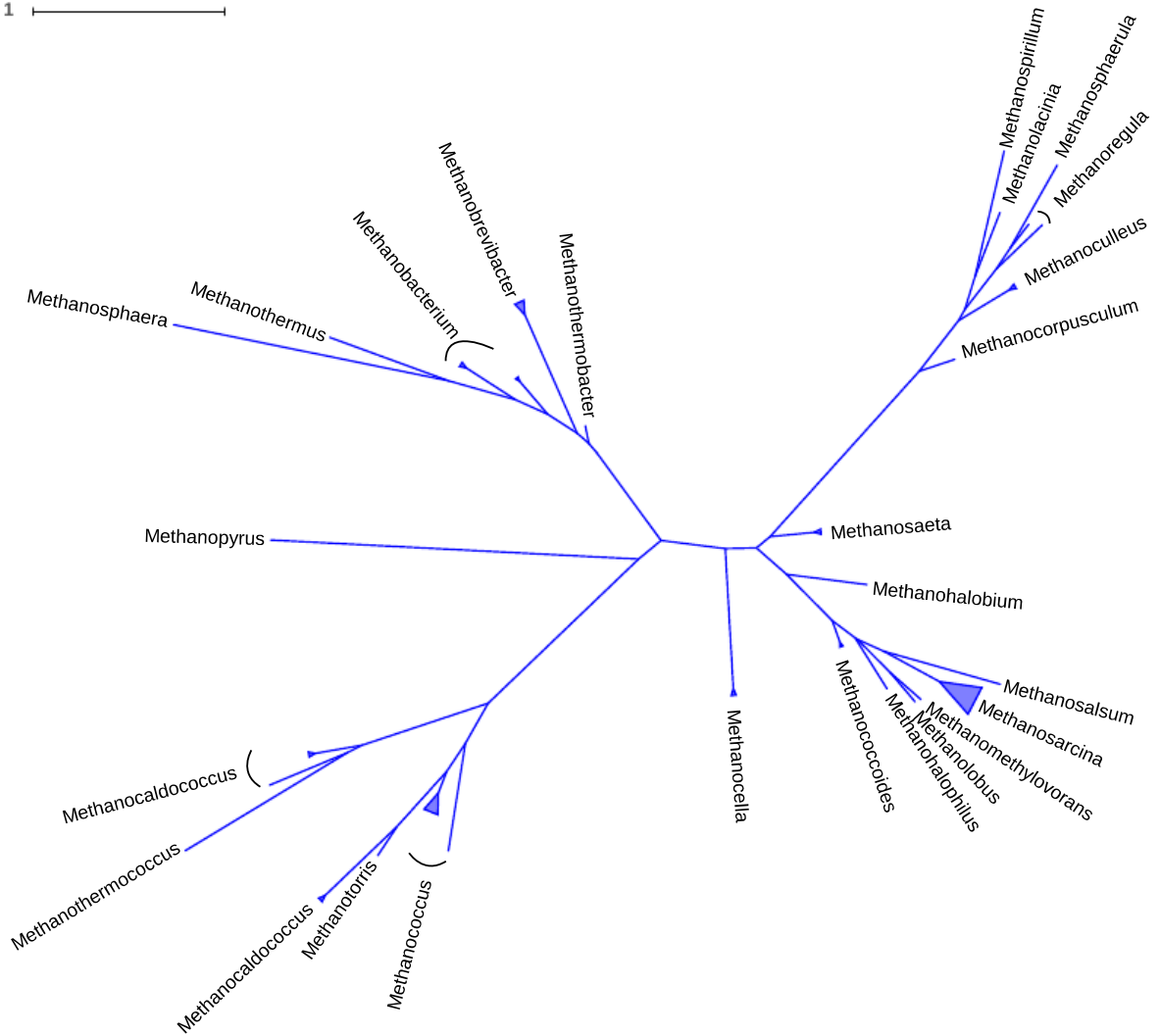


Figura 15. Filogenia de la subunidad B de la enzima Metil- H_4 MPT coenzima M metiltransferasa (MtrB), todos los organismos pertenecen al dominio Archaea y específicamente al phylum Euryarchaeota.

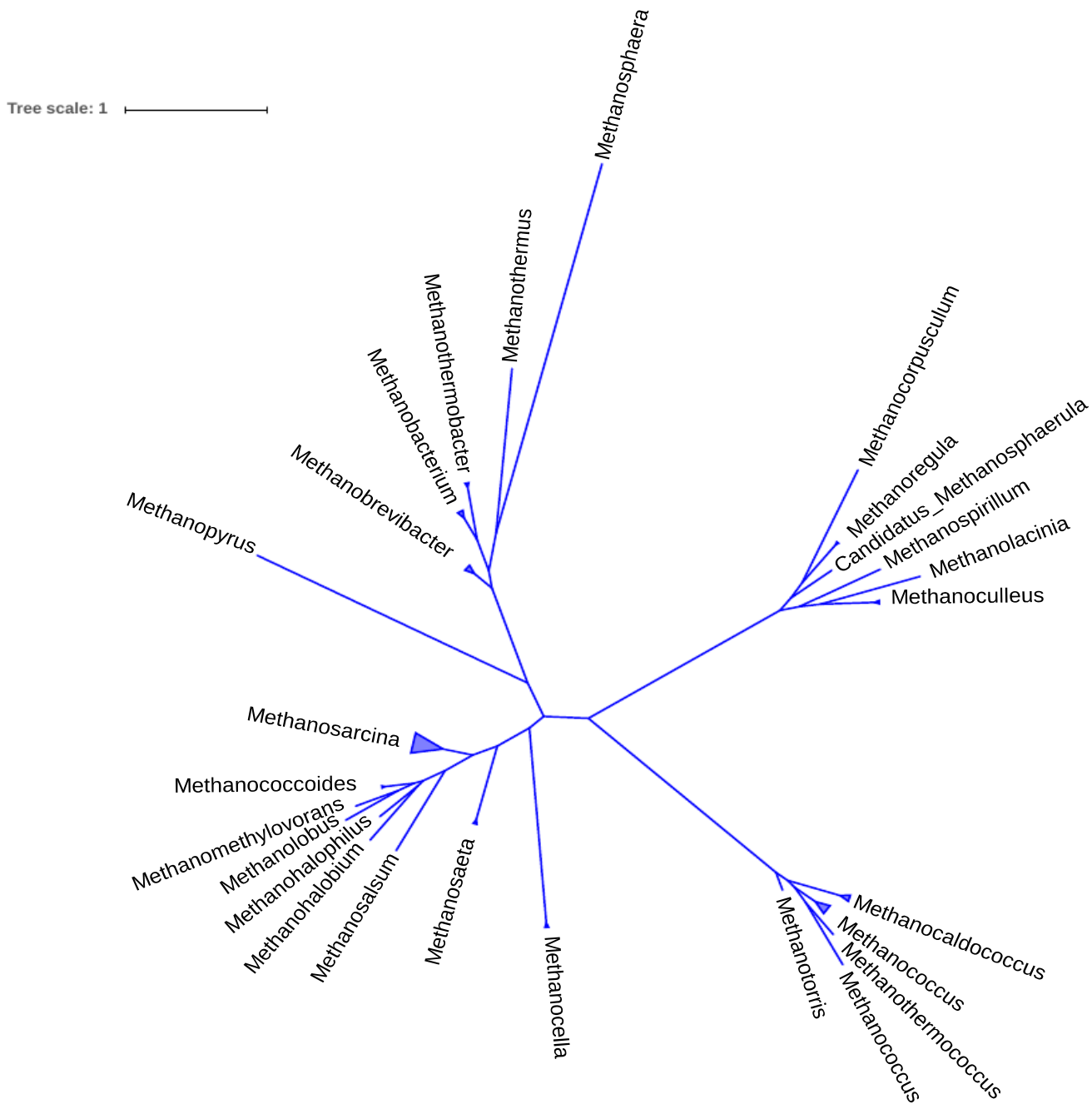


Figura 16. Filogenia de la subunidad C de la enzima Metil-H₄MPT coenzima M metiltransferasa (MtrC), todos los organismos pertenecen a Archea y a Euryarchaeota.

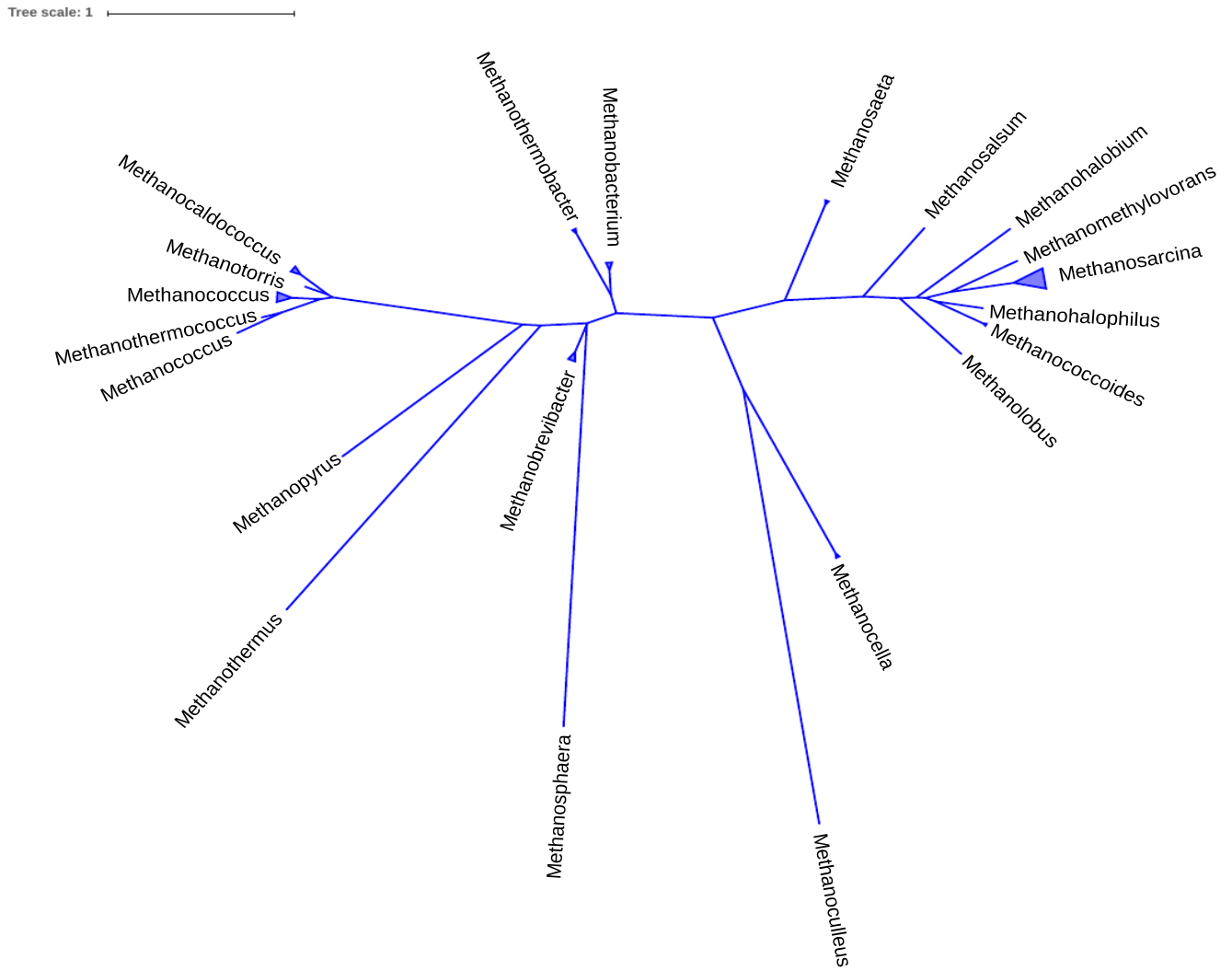


Figura 17. Filogenia de la subunidad D de la enzima Metil-H₄MPT coenzima M metiltransferasa (MtrD), en donde todos los organismos pertenecen al phylum Euryarchaeota.

Tree scale: 1

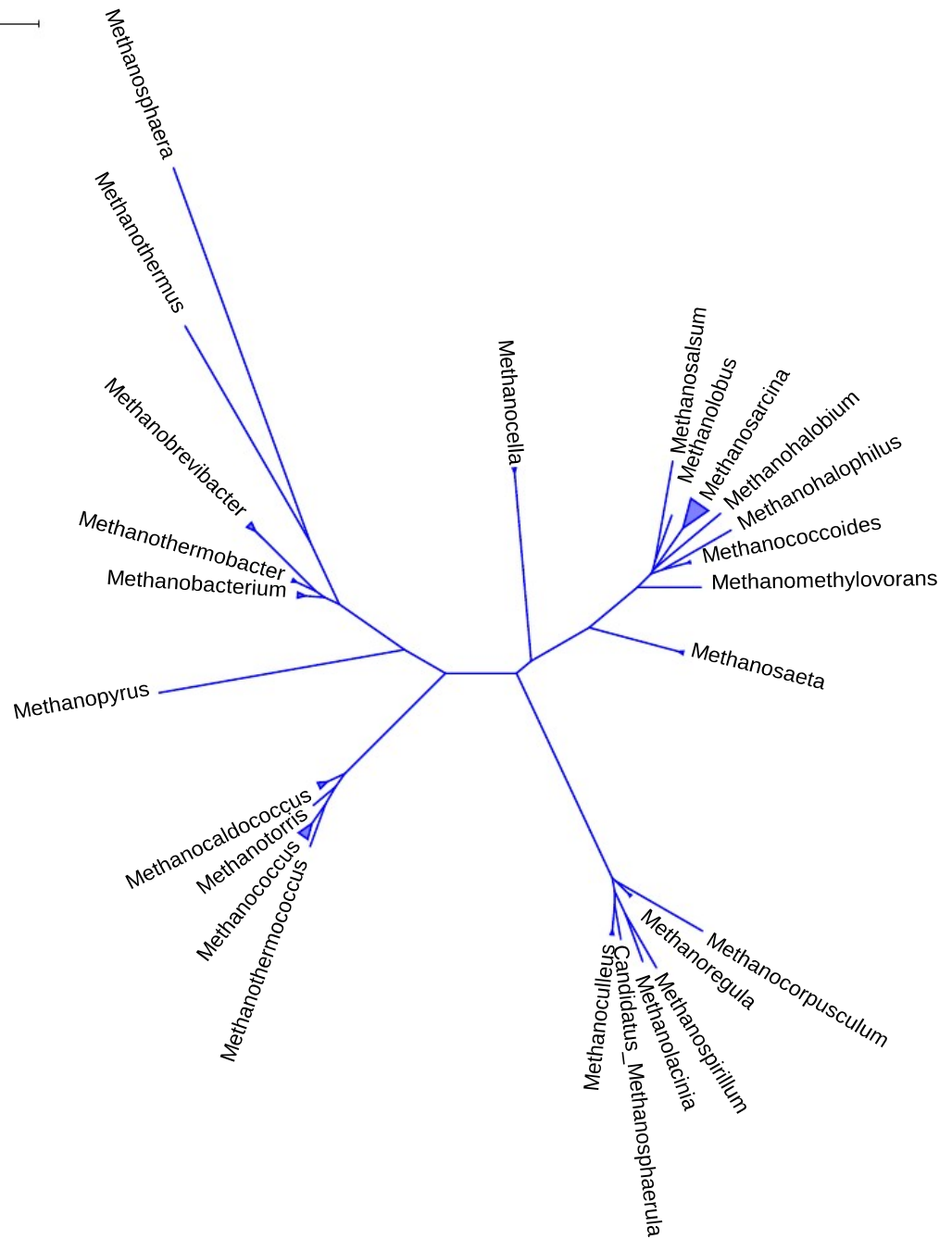


Figura 18. Filogenia de la subunidad E de la enzima Metil- H_4 MPT coenzima M metiltransferasa (MtrE).

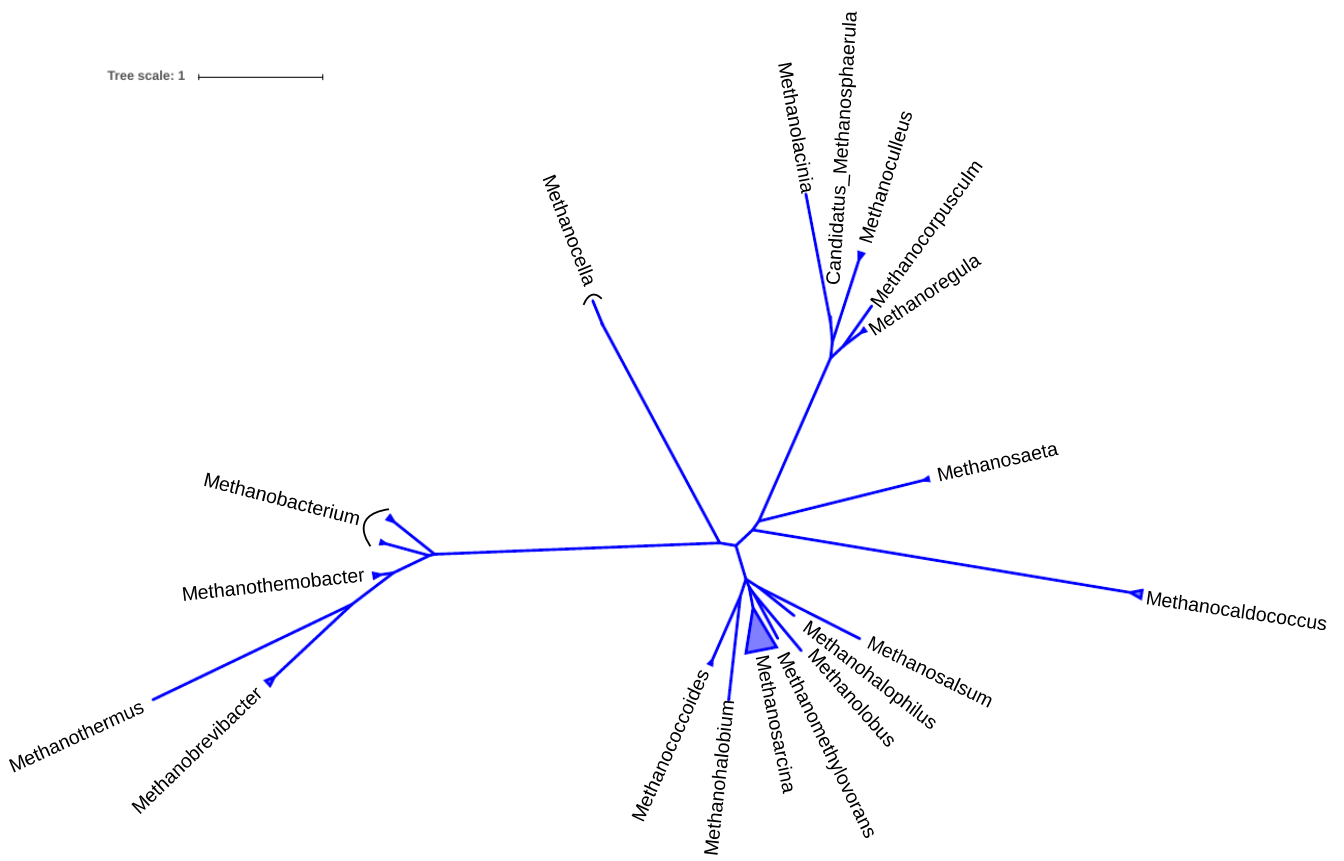


Figura 19. Filogenia de la subunidad F de la enzima Metil- H_4 MPT coenzima M metiltransferasa (MtrF).

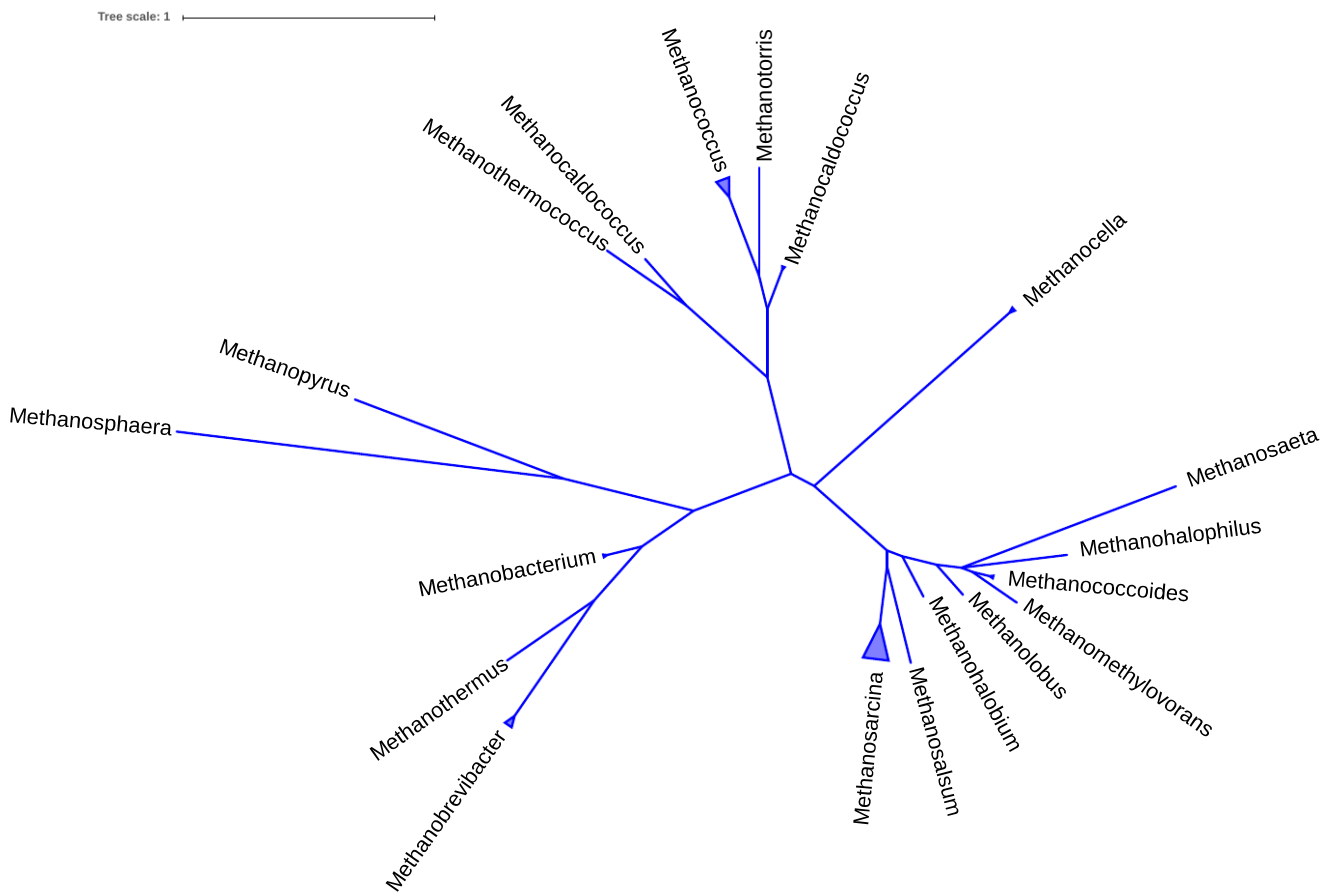


Figura 20. Filogenia de la subunidad G de la enzima Metil-H₄MPT coenzima M metiltransferasa metiltransferasa (MtrG).

Tree scale: 1

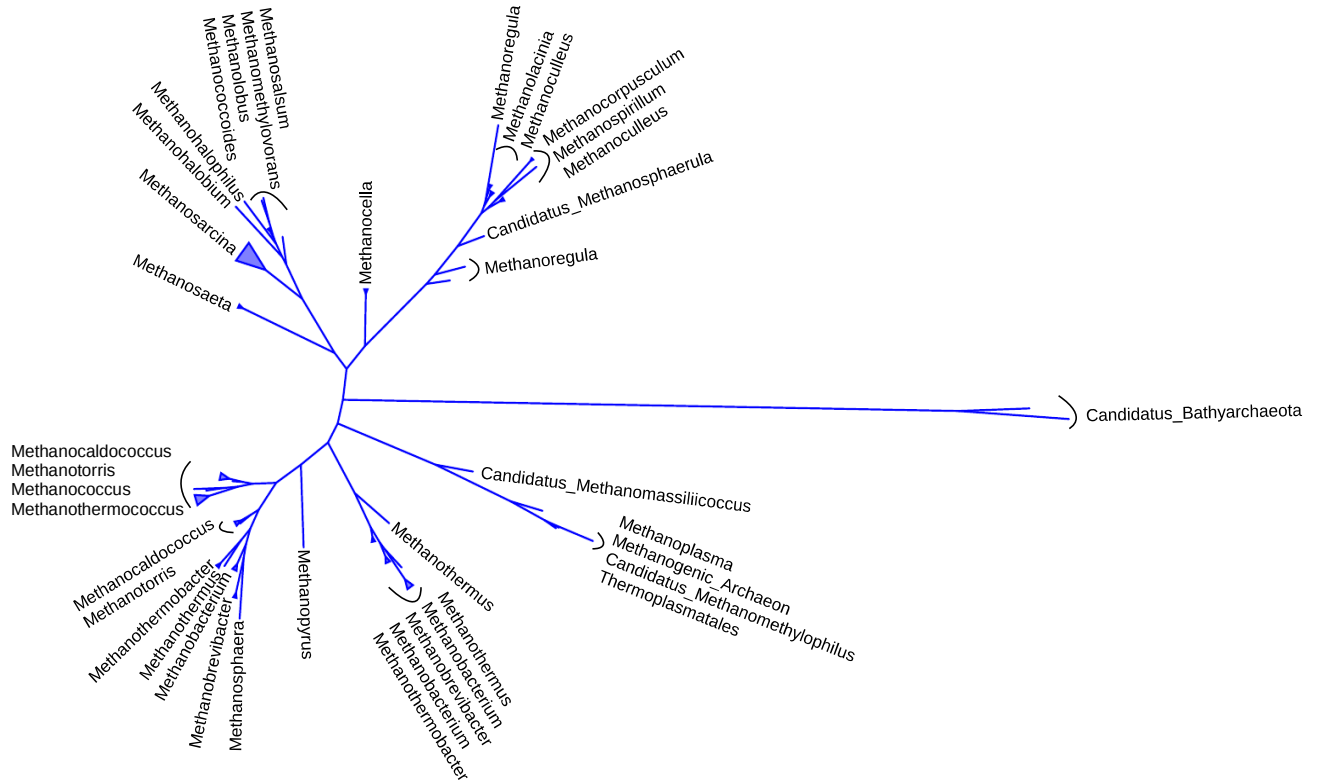


Figura 22. Filogenia de la subunidad alfa de la enzima metil coenzima M reductasa (McrA), enzima clave en la producción de metano. Se muestra que las ramas pertenecientes a las secuencias de Bathyarchaeota son más largas (más divergentes) que las de los organismos pertenecientes al phylum Euryarchaeota.

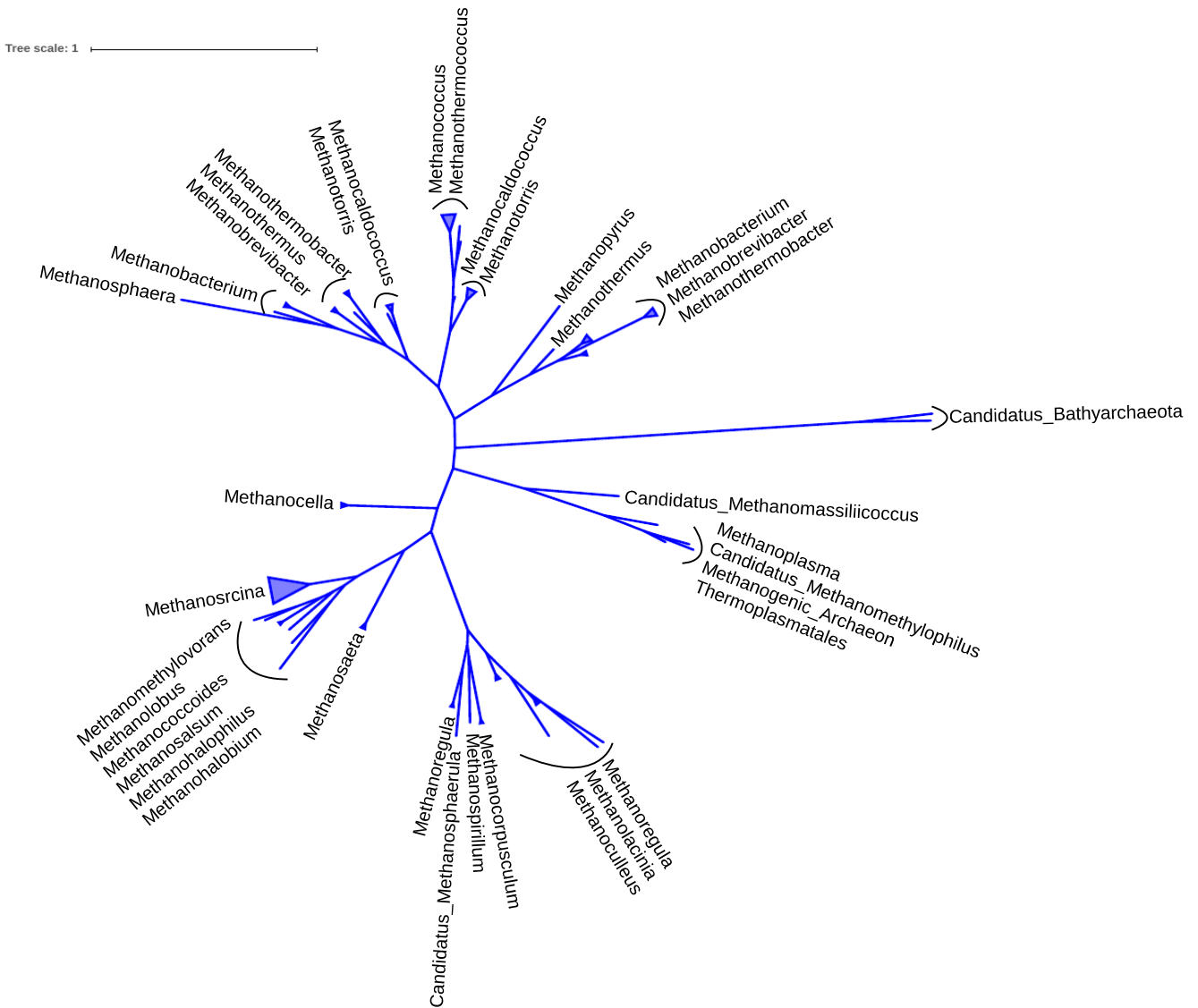


Figura 23. Filogenia de la subunidad beta de la enzima metil coenzima M reductasa (McrB). Al igual que la subunidad alfa (Figura 21), las ramas pertenecientes a Bathyarchaeota son más largas (más divergentes) que las del resto de organismos pertenecientes al phylum Euryarchaeota.

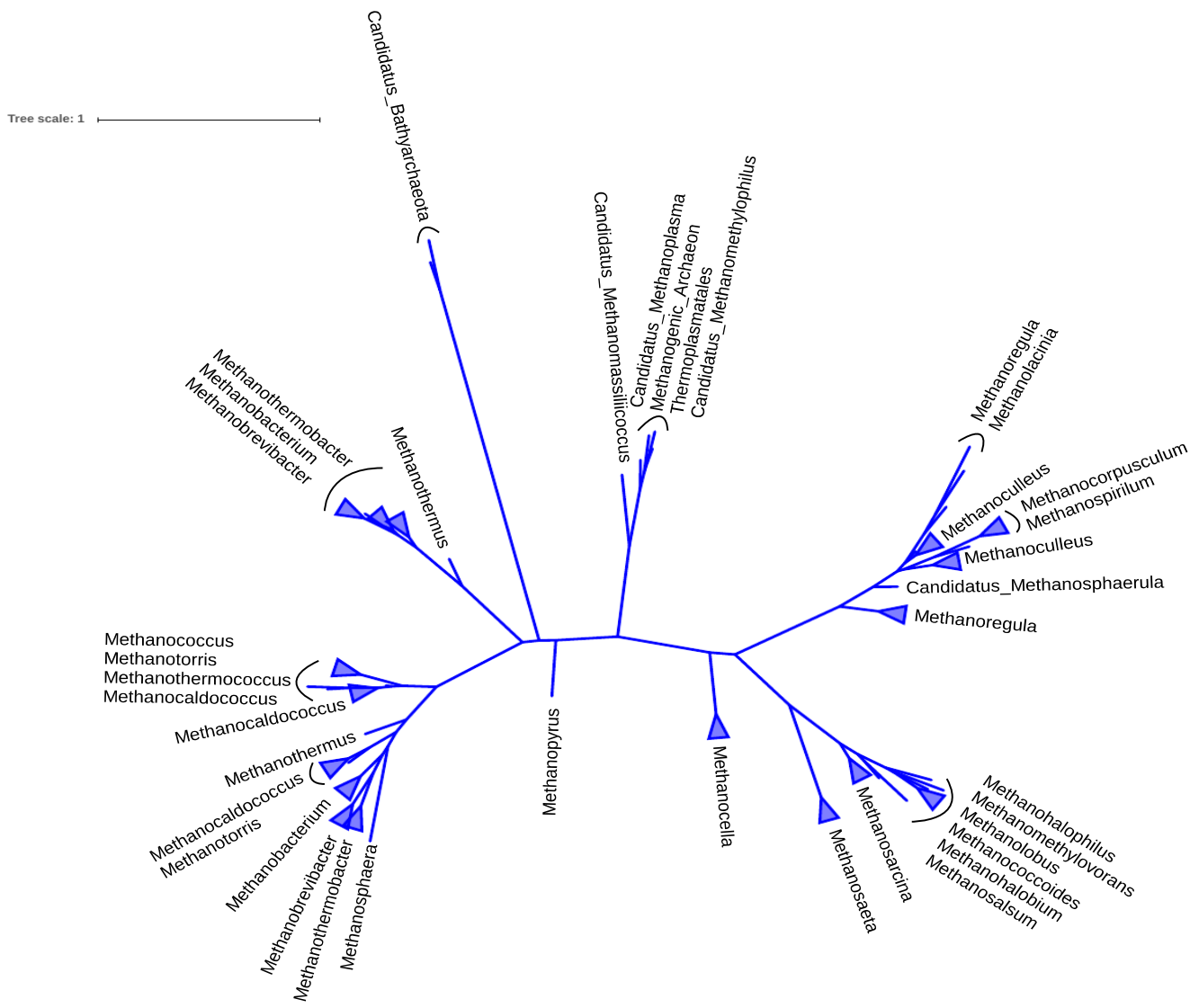


Figura 24. Filogenia de la subunidad gamma de la enzima metil coenzima M reductasa (McrG), en la cual se repite el mismo patrón que con las otras dos subunidades de esta enzima, las subunidades alfa (Figura 21) y beta (Figura 22), en las cuales las ramas pertenecientes a las secuencias de Bathyarchaeota son más largas con respecto a las de los demás organismos pertenecientes al phylum Euryarchaeota.

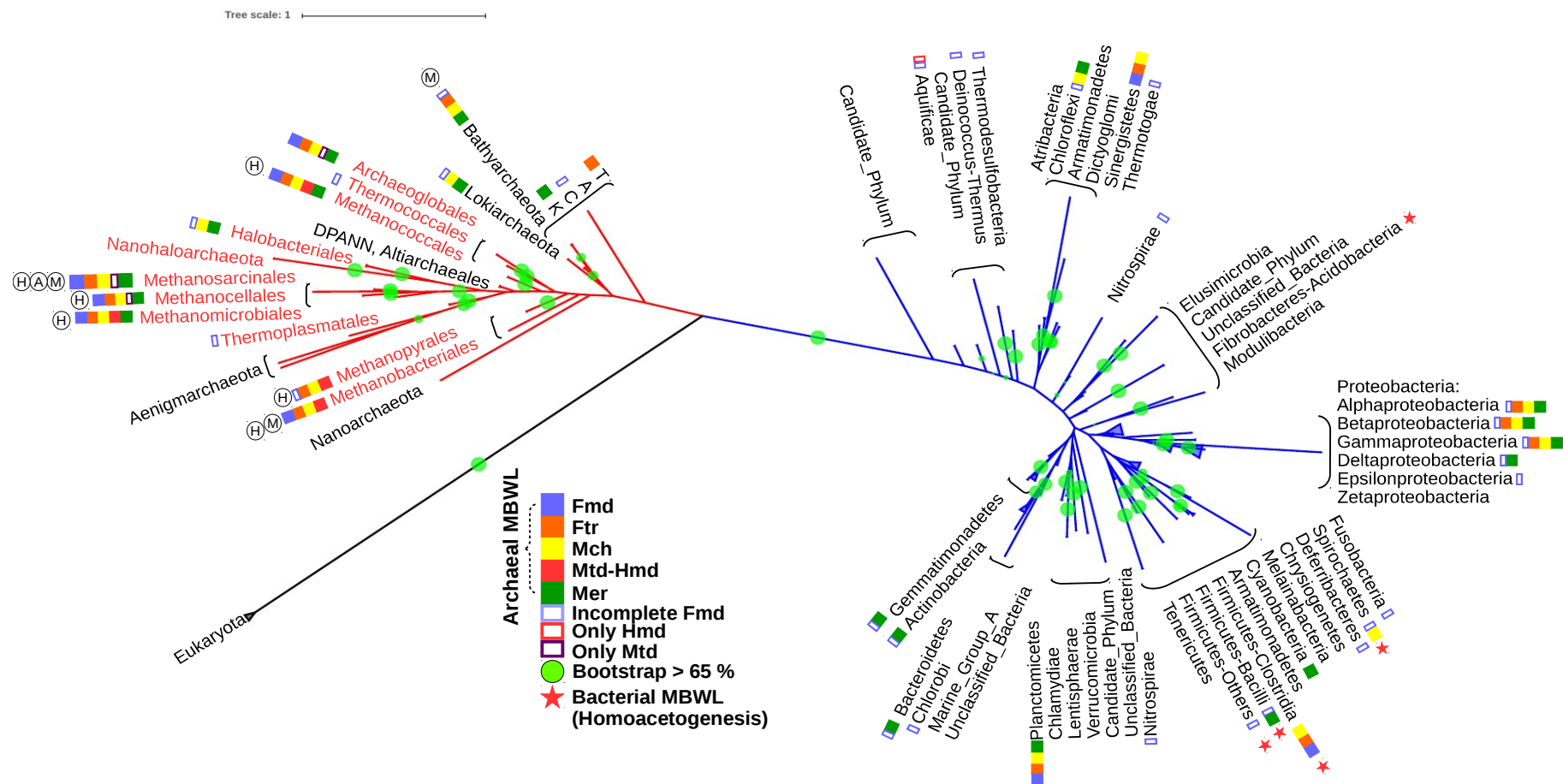


Figura 25. Filogenia basada en SSU-RNA, construida con el conjunto de datos publicado en el último trabajo del árbol de la vida (**Hug L., et al. 2016**). Se muestra a las enzimas Fmd (cuadro azul), Ftr (cuadro anaranjado), Mch (cuadro amarillo), las dos enzimas Mtd y Hmd (cuadro rojo) y la enzima Mer (cuadro verde), enzimas que se utilizan también en la ruta de Wood-Ljungdahl (Archaeal MBWL), también se pueden apreciar a la enzima Mtd sola (rectángulo con contorno morado), a Hmd sola (rectángulo con contorno rojo) y a Fmd incompleta (rectángulo con contorno azul). Las ramas en color azul corresponden a bacterias, la negra a eucariontes y las que están en rojo a arqueas. En algunos linajes arqueanos se pueden observar círculos blancos en donde se pueden apreciar las letras H para metanogénesis hidrogenotrófica (**Lessner, 2009**), A para metanogénesis Acetoclástica y M para metanogénesis Metilotrófica. En Bacteria las estrellas representan aquellos linajes capaces de llevar a cabo homoacetogénesis (**Shin et al., 2016**), los círculos verdes en medio de las ramas significa que esas ramas tienen un soporte estadístico con más de mil repeticiones mayor al 65% (bootstrap > 65%).

IX.2 Metanogénesis acetoclástica

Este tipo de metanogénesis utiliza acetato como sustrato inicial, solamente organismos pertenecientes a los géneros *Methanosaeta* y *Methanosarcina* pueden realizar esta variante de metanogénesis, aunque la activación del acetato en acetil coenzima A se lleva a cabo de manera distinta en estos dos géneros. En *Methanosarcina* se utilizan las enzimas acetato quinasa (Ack) y fosfotransacetilasa (Pta); mientras que en *Methanosaeta* la función de estas dos enzimas es llevada a cabo por una sola, la acetil coenzima A sintetasa formadora de AMP cíclico (ACS-AMP).

En la Tabla 5 y la Figura 2B se muestra la ruta de este tipo de metanogénesis en el género *Methanosarcina*. La primer enzima es la acetato quinasa (Ack) que tiene una distribución amplia en Bacterias, mientras que en arqueas solamente se encuentra en miembros de *Methanosarcina*; Esta enzima también está presente en hongos, plantas, algas verdes y protistas. Las arqueas que poseen esta enzima quedan agrupadas con bacterias del tipo Firmicutes-Clostridia y Synergistetes (Figura 26). El segundo paso enzimático lo lleva a cabo la enzima fosfotransacetilasa (Pta), enzima con amplia distribución en Bacteria y en Archaea solo presente en miembros de los géneros *Methanosarcina* y *Methanobacterium*. En el caso de *Methanosarcina* asociadas a Firmicutes-Clostridia y en el de *Methanobacterium*, asociados a Spirochaetes (Figura 27), ambos géneros de bacterias capaces de realizar acetogénesis (Figura 25).

En el siguiente paso enzimático la Acetil-CoA, producto de los dos paso enzimáticos anteriores, es dividida en su porción carboxilo en su grupo metilo y la coenzima A por la enzima bifuncional monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintetasa (CODH/ACS) tipo II (Figura 28). Esta es una enzima multimérica que consta de cinco subunidades (CdhA-E) y que hasta el momento se sabe que solo participa en el proceso de metanogénesis.

Nuestros resultados muestran que las subunidades CdhC (Figura 31), CdhB (Figura 30) y CdhD (Figura 32) tienen una distribución amplia en Archaea, mientras que en Bacteria solo algunas especies tienen alguna de estas tres subunidades. Nuestros resultados sugieren que estas tres subunidades son una nueva invención de las arqueas capaces de realizar metanogénesis acetoclástica y que posiblemente las bacterias que las tienen las adquirieron posteriormente (ver discusión). Las subunidades CdhA (Figura 29) y CdhE (Figura 33) tienen una distribución amplia tanto en Archaea como en Bacteria, lo cual resulta interesante, al menos para el caso de la subunidad CdhA, ya que es esta subunidad la que tiene la actividad de monóxido de carbono deshidrogenasa y es la que regula el paso de electrones a través de los centros hierro-azufre hasta pasarlos a la ferredoxina o a la flavín adenín dinucleótido (FAD). Por otro lado, la subunidad CdhE tiene al corrinóide al cual se le transfiere el grupo metilo proveniente de la acetil coenzima A (Figura 28) que posteriormente será transferido al cofactor tetrahidrosarcinopterinina (H₄SPT), que solo difiere en una

porción glutamilo adicional con respecto a la tetrahidrometanopterin. La distribución filogenética de CdhE sugiere una posible adquisición de Bacteria proveniente de Archaea (Figura 33).

En la Tabla 6 se muestra un resumen de las presencias y ausencias de las enzimas que participan en la metanogénesis acetoclástica. Se puede apreciar que tanto Ack como Pta tienen una distribución muy amplia en Bacteria; mientras que en Archaea solo miembros del phylum Euryarchaeota contienen estas enzimas. Se muestra un acercamiento a las presencias y ausencias dentro del phylum Euryarchaeota (Tabla Suplementaria 2); para el caso de la CODH/ACS analizada (tipo II) destaca el hecho de que todas las subunidades las tiene el phylum Bathyarchaeota, que no puede realizar metanogénesis por esta ruta, ya que las primeras dos enzimas activadoras del acetato no están presentes en este phylum de Archaea, ni la enzima encargada de transferir el grupo metilo a la metil coenzima M reductasa (Figura Suplementaria 4).

Lás últimas dos enzimas que participan en esta ruta metabólica, la metiltransferasa (Mtr) y la metil coenzima M reductasa (Mcr) están compartidas con la metanogénesis hidrogenotrófica, por lo que su distribución y sus relaciones filogenéticas ya fueron descritas y se encuentran resumidas en la Tabla 3 y en las Figuras 22 a 24.

Tabla 5. Resumen de las diferentes enzimas, y subunidades en el caso de las enzimas multiméricas, utilizadas en la metanogénesis acetoclástica. Se incluyen el nombre de la enzima, el número de subunidades que conforman a la enzima, los números asignados por la “enzyme commission” (Número E.C.) y la función asignada, el nombre de los genes y la reacción que llevan a cabo.

Metanogénesis Acetoclástica				
Enzima	Nº de subunidades	Número E.C. Función	Genes	Reacción
1. Acetato Quinasa	1	2.7.2.1 Transferasa Fosfotransferasa	ack	ATP + acetato \rightleftharpoons ADP + acetyl fosfato (Gorrell, et al., 2005).
2. Fosfotransacetilasa	1	2.3.1.8 Transferasa Aciltransferasa	pta	acetyl-CoA + fosfato \rightleftharpoons acetyl fosfato + coenzima A (Stadman, E. R. 1952).
3. Complejo Acetyl-CoA descarboxilasa/sintetasa	5	1.2.7.4 Oxidoreductasa Monóxido de carbono deshidrogenasa Anaeróbica	cdhA1 (subunidad α) cdhB1 (subunidad ϵ)	monóxido de carbono + 2 ferredoxinas oxidadas con un centro [hierro-azufre] + H ₂ O \rightleftharpoons CO ₂ + 2 ferredoxinas reducidas con un centro [hierro-azufre] + 2 H ⁺ (Can, et al., 2014).
		2.3.1.169 Transferasa CO-metilado acetyl-CoA sintasa	cdhC1 (subunidad β)	acetyl-CoA + una proteína [Co(I) corrinóide Fe-S] + H ⁺ \rightleftharpoons monóxido de carbono + una proteína [methyl-Co(III) corrinóide Fe-S] + coenzima A (Doukov, et al., 2002).
		2.1.1.245 Transferasa 5-metiltetrahidrosarcinopteroína: Proteína corrinóide con hierro-azufre Co-metiltransferasa	cdhD1 (subunidad δ)	Una proteína [methyl-Co(III) corrinóide Fe-S] + tetrahidrosarcinopteroína \rightleftharpoons una proteína [Co(I) corrinóide Fe-S] + 5-metil-tetrahidrosarcinopteroína + H ⁺ (Maupin-Furlow, J. y Ferry, J. G., 1996).
			cdhE1 (subunidad γ)	
4. Metil-H4MPT:coenzima M metiltransferasa	8	2.1.1.86 Transferasa Metiltransferasa	mtrA, mtrB, mtrC, MtrD, mtrE, mtrF, mtrG and mtrH	2 Na ⁺ + N5-metiltetrahidrometanoopteroína + coenzima M \rightleftharpoons 2 Na ⁺ + tetrahidrometanoopteroína + methyl-CoM (Gärtner, et al., 1993).
4. Metil-coenzima M reductasa	3	2.8.4.1 Transferasa coenzima-B sulfoetiltransferasa	mcrA, mcrB y mcrG (methyl-coenzima M reductasa I).	Coenzima B + methyl-CoM \rightleftharpoons CoB-CoM heterodisulfuro + metano (Scheller, et al., 2010).

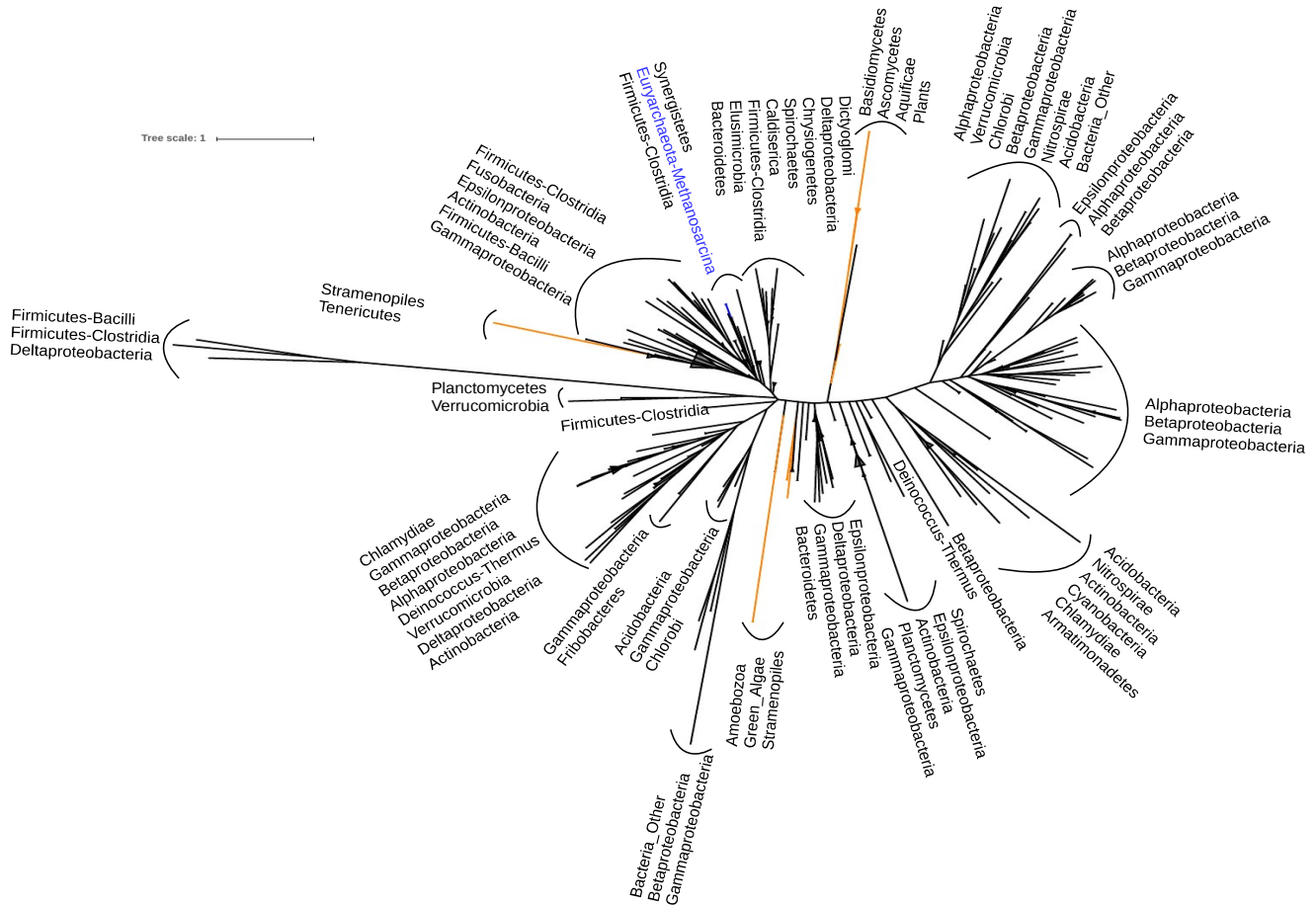


Figura 26. Filogenia de la enzima acetato quinasa (Ack). Se pueden observar en color anaranjado las ramas pertenecientes a organismos eucariontes, en color negro las correspondientes a bacterias y en color azul las ramas pertenecientes a arqueas. En el caso de las arqueas, el único género que contiene la enzima, es Methanosarcina, que aparecen estrechamente asociada al phylum Firmicutes, específicamente de la clase Clostridia.

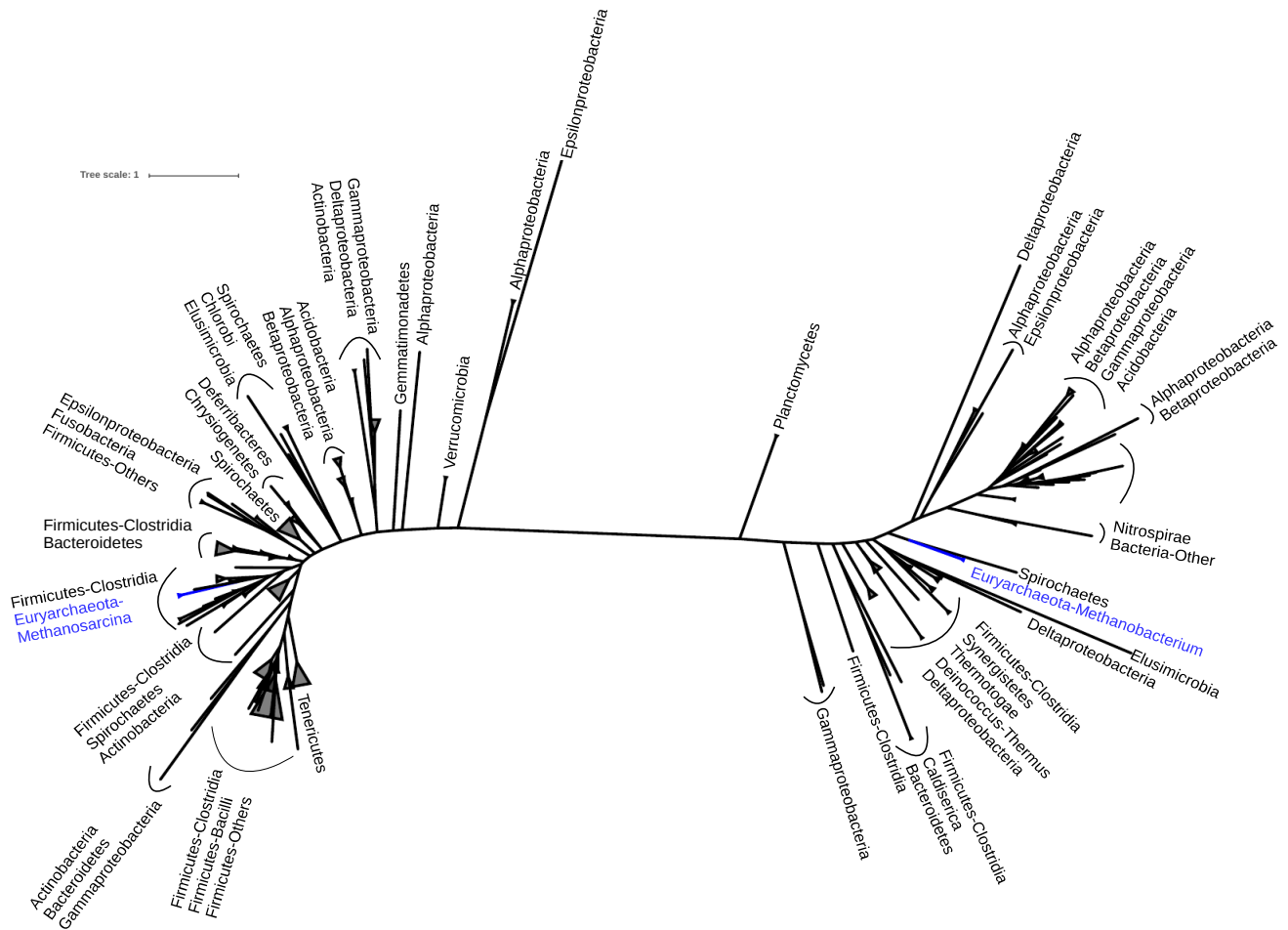
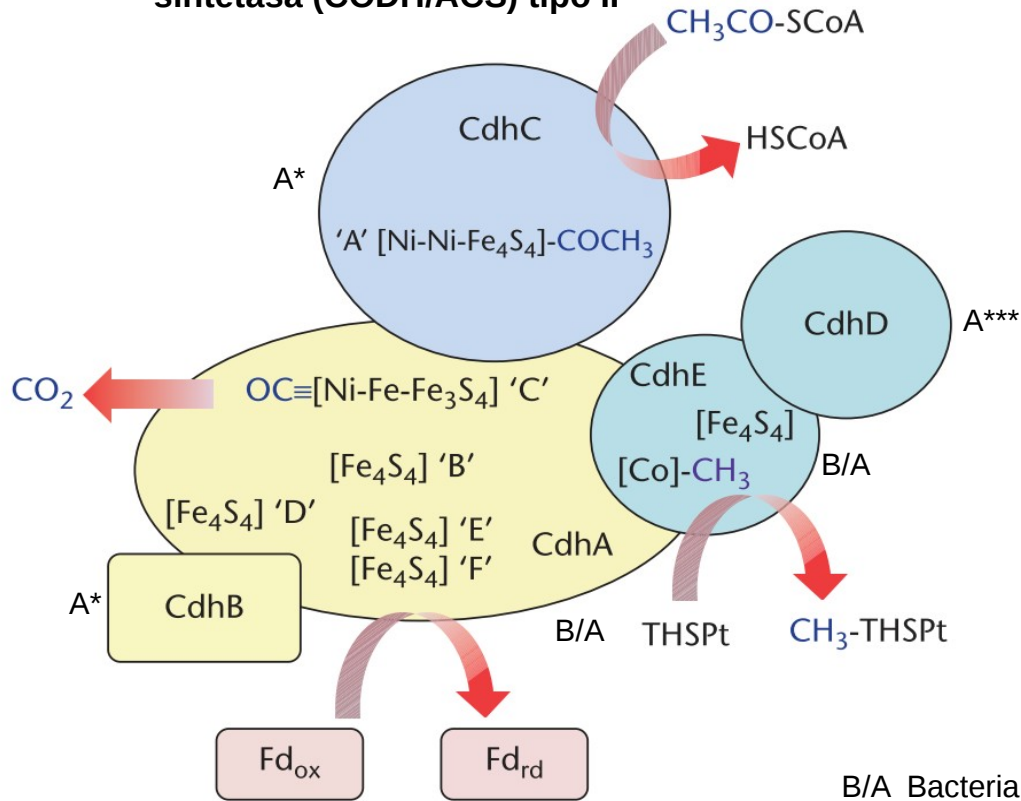


Figura 27. Filogenia de la enzima fosfotransacetilasa (Pta), las ramas en color negro representan linajes de organismos pertenecientes al dominio Bacteria y en color azul las que representan a organismos del dominio Archaea, los géneros de Archaea Methanosarcina y Methanobacteria, ambos géneros asociados a bacterias (del phylum Firmicutes, específicamente la clase Clostridia, y del phylum Spirochaetes) con capacidades acetogénicas.

Monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-CoA sintetasa (CODH/ACS) tipo II



B/A Bacteria y Archaea
 A*** Archaea y 3 sec. de Bacteria
 A* Archaea y 1 sec. de Bacteria

Figura 28. Representación esquemática de las diferentes subunidades de la enzima monóxido de carbono descarboxilasa/acetil CoA sintasa (CODH/ACS) tipo II. Se sabe que la subunidad CdhC se encarga de separar el grupo carboxilo y el grupo metilo de la acetil-CoA, posteriormente CdhE pasa el grupo metilo a la tetrahydrosarcinopterina (THSPt), mientras que la subunidad CdhA reduce ferredoxina y expulsa al grupo carboxilo que posteriormente será oxidado en dióxido de carbono, las subunidades CdhB y CdhD parece que solo funcionan como subunidades accesorias de CdhA y de CdhE respectivamente. La distribución de cada una de las subunidades está indicada B/A para Bacteria y Archaea, A* para Archaea y una secuencia de Bacteria y A*** para Archaea y tres secuencias de Bacteria, imagen modificada de **Lessner 2009**.

Tabla 6. Presencias (Cuadros amarillos) y ausencias (Cuadros vacíos) de las enzimas, o subunidades, que participan en la metanogénesis acetoclástica.

Enzima Número EC	Metanogénesis Acetoclástica						
	1. Acetate Kinase 2.7.2.1	2. Phospho transace tylase 2.3.1.8	3. acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex				
Gen	ack	pta	cdhA1 α	cdhC1 β	cdhD1 δ	cdhE1 γ	cdhB1 ε
Animals-Vertebrates							
Animals-Arthropods							
Animals-Ascidians							
Animals-Cnidarians							
Animals-Poriferans							
Animals-Echinoderms							
Animals-Flatworms							
Animals-Lancelets							
Animals-Placozoans							
Plants-Monocots							
Plant-Ferns							
Plant-Mosses							
Plants-Eudicots							
Plants-Green algae							
Fungi-Ascomycetes							
Fungi-Basidiomycetes							
Protists-Amoebozoa							
Protists-Alveolates							
Protists-Stramenopiles							
Gammaproteobacteria – Enterobacteria							
Gammaproteobacteria – Others							
Betaproteobacteria							
Epsilonproteobacteria							
Deltaproteobacteria							
Alphaproteobacteria							
Other proteobacteria							
Firmicutes – Bacilli							
Firmicutes – Clostridia							
Firmicutes – Others							
Tenericutes							
Actinobacteria							
Cyanobacteria							
Chloroflexi							
Deinococcus-Thermus							
Armatimonadetes							
Unclassified							
Terrabacteria group							
Chlamydiae							
Verrucomicrobia							
Spirochaetes							
Acidobacteria							
Fibrobacteres							
Elusimicrobia							
Fusobacteria							
Gemmatimonadetes							
Synergistetes							
Planctomycetes							
Bacteroidetes							
Chlorobi							
Aquificae							
Thermotogae							
Caldiserica							
Chrysiogenetes							
Deferrubacteres							
Dictyoglomi							
Nitrospirae							
Thermodesulfobacteria							
Bacteria-Other							
Unclassified Bacteria							
Euryarchaeota							
Crenarchaeota							
Thaumarchaeota							
Nanoarchaeota							
Korarchaeota							
Lokiarchaeota							
Bathyarchaeota							
Unclassified Archaea							

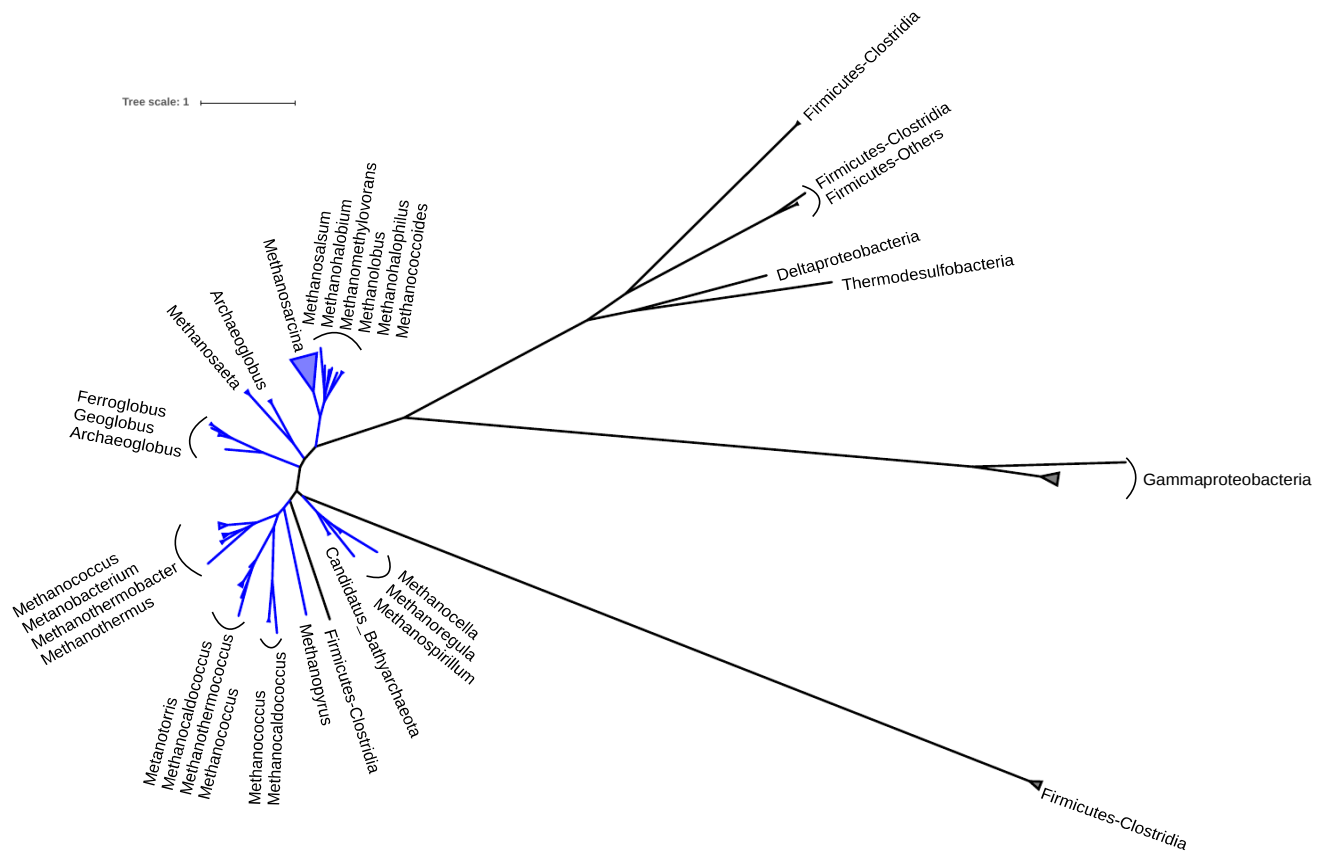


Figura 29. Filogenia de la subunidad A (CdhA) de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil coenzima A sintetasa (CODH/ACS). En color negro se muestran las ramas de organismos pertenecientes al dominio Bacteria, mientras que en color azul las pertenecientes al dominio Archaea.

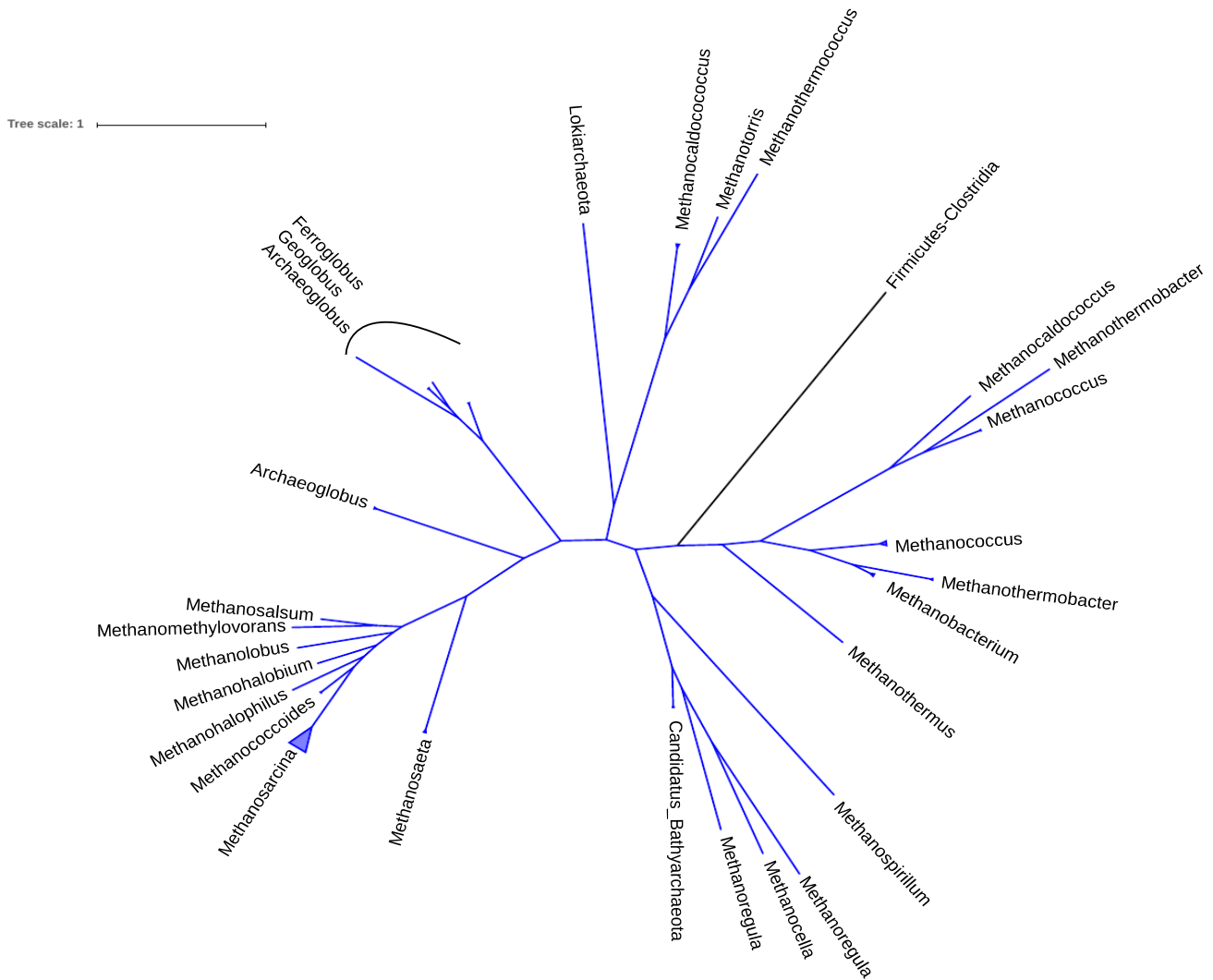


Figura 30. Filogenia de la subunidad B (CdHb) de la enzima bifuncional CODH/ACS. Miembros del dominio Archaea tienen la enzima, específicamente organismos pertenecientes al phylum Euryarchaeota, uno perteneciente al phylum Bathyarchaeota y una bacteria perteneciente a los Firmicutes de la clase Clostridia.

Tree scale: 1

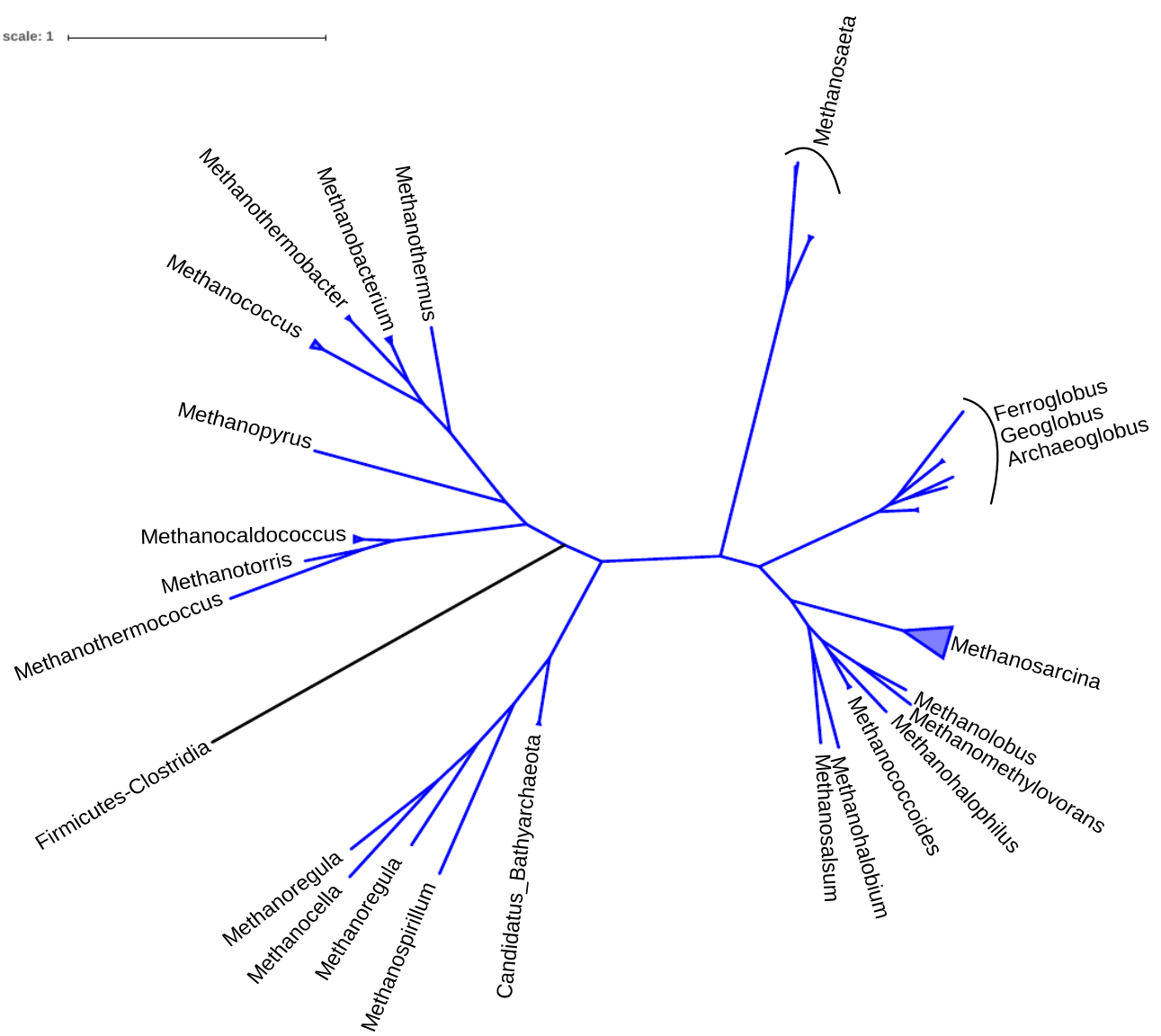


Figura 31. Filogenia de la subunidad C (CdhC) de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil coenzima A sintetasa (CODH/ACS), en color negro se muestra la rama de la única bacteria que contiene la enzima, mientras que en color azul se encuentran las ramas de organismos pertenecientes al dominio Archaea, perteneciendo la mayoría al phylum Euryarchaeota. Una secuencia homóloga fue encontrada en el phylum Bathyarchaeota.

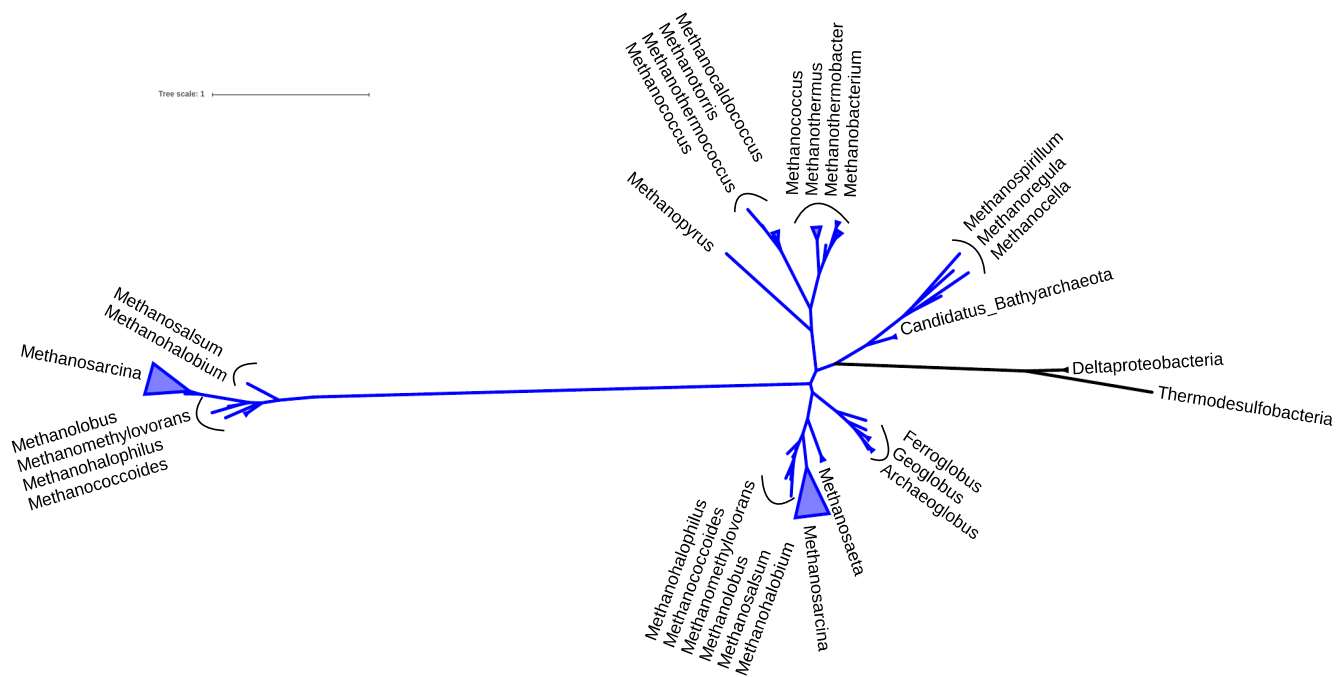


Figura 32. Filogenia de la subunidad D (CdHD) de la enzima bifuncional CODH/ACS. Se muestran en color negro las ramas pertenecientes a organismos del dominio Bacteria y en color azul las ramas pertenecientes a organismos del phylum Archaea. Al igual que las otras subunidades, todas las arqueas que contienen la enzima pertenecen al phylum Euryarchaeota y solo un organismo perteneciente a Bathyarchaeota tiene la enzima. Las bacterias que tienen la enzima pertenecen a los phyla Proteobacteria (específicamente a la clase Deltaproteobacteria) y Thermodesulfobacteria.

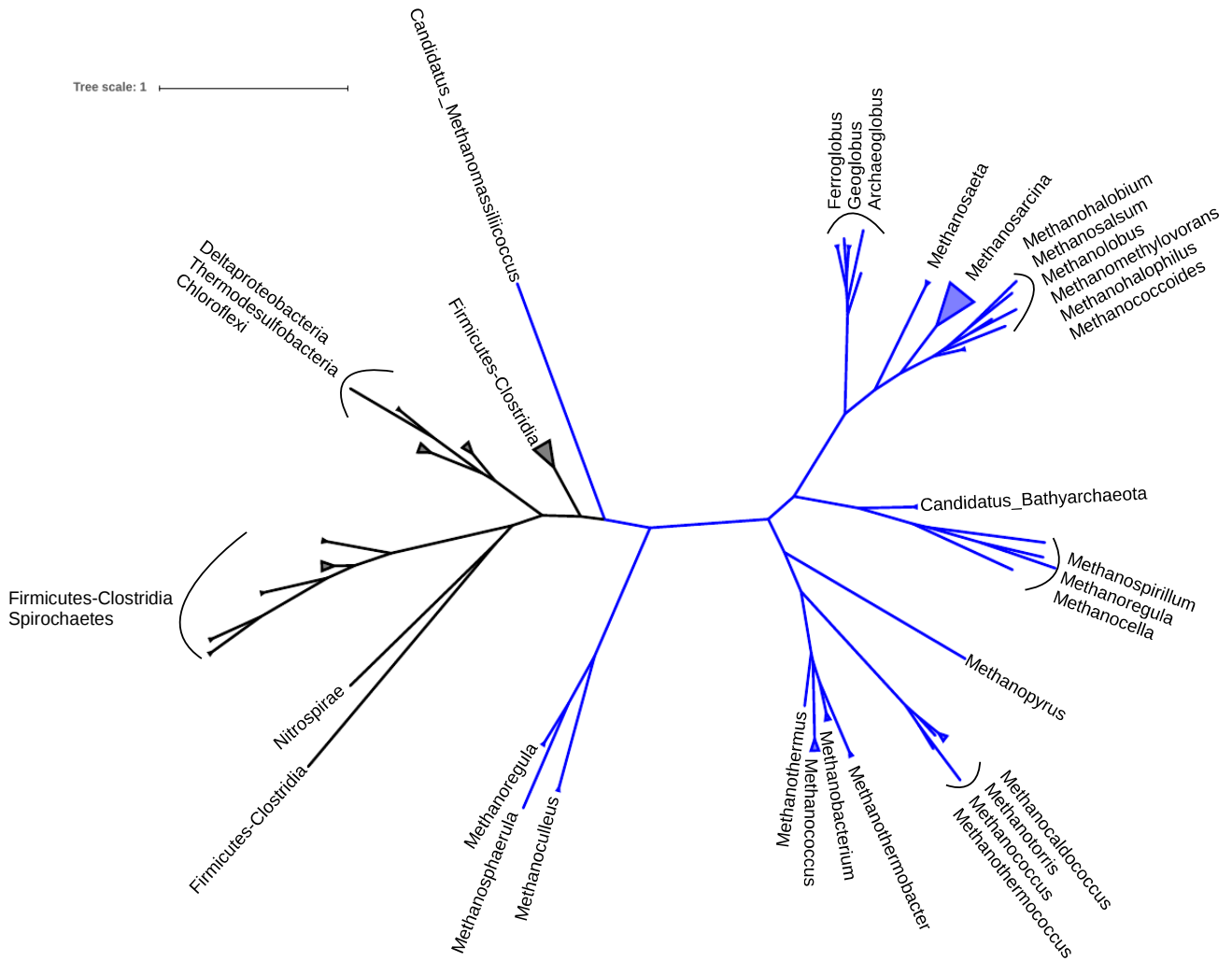


Figura 33. Filogenia de la subunidad E (CdhE) de la monoxido de carbono deshidrogenasa/acetil coenzima A sintetasa (CODH/ACS), en color negro se muestran las ramas de los organismos que contienen la enzima y que pertenecen al dominio Bacteria, mientras que en color están los organismos pertenecientes al dominio Archaea.

IX.3 Metanogénesis metilotrónica

El uso de compuestos metilados está confinado a un grupo pequeño de metanógenos, todos pertenecientes al phylum Euryarchaeota, específicamente a los órdenes Methanosarcinales y algunas especies del género *Methanosphaera* que son capaces de usar metanol, metilaminas, y tioles metilados. Se sabe que los dos nuevos candidatos a phyla, Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota también son capaces de realizar metanogénesis aprovechando compuestos metilados. Las diferentes variantes de metanogénesis basada en el uso de compuestos metilados se ilustra en la figura 2C y se enlistan en la tabla 7.

Cuando el sustrato inicial es el metanol, se requieren de tres proteínas para transferir el grupo metilo a la metil coenzima M reductasa, dos de ellas (MtaA y MtaB) con actividad de metil transferasa y una asociada a un corrinoide (MtaC) (Figura 2C y tabla 7). En este trabajo sólo se analizaron a las proteínas con actividad de metiltransferasa y nuestros resultados muestran que MtaA se encuentra ampliamente distribuida en Bacteria, Archaea y Eukarya, con una historia evolutiva que implica diversas pérdidas y transeferencias horizontales entre organismos.

La filogenia de esta enzima (Figura 34) muestra que las ramas pertenecientes a organismos eucariontes se encuentran asociados a cianobacterias y bacteroidetes, mientras que las ramas pertenecientes a Euryarchaeota se encuentran siempre asociadas a ramas que pertenecen a bacterias del phylum Firmicutes, de la clase Clostridia y a Proteobacterias, específicamente a Deltaproteobacterias. En el caso de MtaB, en Archaea se restringe al phylum Euryarchaeota y en Bacteria a algunos miembros de Firmicutes-Clostridia y Deltaproteobacteria (Figura 35 y tabla 8), todas las ramas pertenecientes a bacterias se encuentran separadas de las ramas pertenecientes a arqueas, a excepción de una rama de *Methanocella* que aparece agrupada con bacterias junto a *Deltaproteobacteria*.

Cuando las metilaminas son el sustrato inicial existen dos proteínas con actividad de metiltransferasa que están involucradas en la transferencia del grupo metilo del sustrato a la metil coenzima M reductasa. MtbA está compartida por todas las rutas basadas en metilaminas, mientras que la otra varía según el sustrato inicial que se utilice (Figura 2C, parte de metilaminas). Cuando la monometilamina es el sustrato inicial, la proteína encargada de transferir el grupo metilo es la enzima MtmB. Nuestros análisis muestran que esta enzima está presente en Archaea en los phyla Euryarchaeota y Crenarchaeota, mientras que en Bacteria la tienen organismos pertenecientes al phylum Firmicutes, específicamente a la clase Clostridia (Figura 36), que aparecen en la misma rama en la que están los organismos pertenecientes al phylum Crenarchaeota.

La enzima MtbB, que participa en la metanogénesis basada en dimetilamina, tiene una distribución muy restringida, sólo algunos miembros del dominio Archaea la tienen, miembros pertenecientes al phylum Euryarchaeota, entre los que se encuentran *Methanosarcina*,

Methanobolus, y *Candidatus Methanomassiliicoccus*, mientras que solo una bacteria termófila acetoxidante perteneciente a Firmicutes-Clostridia (*Thermacetogenium phaeum*) tiene la enzima (Figura 37). Cuando el compuesto inicial es trimetilamina, la primer enzima con actividad de metiltransferasa es MttB, de esta enzima nuestros resultados sugieren una distribución restringida a algunos miembros del dominio Archaea, específicamente miembros del phylum Euryarchaeota, que en la filogenia (Figura 38) aparecen agrupados, mientras que las bacterias que la tienen también aparecen agrupadas y todas pertenecen al phylum Firmicutes, a la clase Clostridia.

Para la enzima MtbA, enzima compartida por todas las rutas basadas en metilaminas, nuestros análisis muestran una amplia distribución en todo el dominio Bacteria, mientras que en el dominio Archaea solo el phylum Euryarchaeota y un miembro del phylum Lokiarchaeota tienen la enzima. En eucariontes tiene presencia en hongos, plantas, algas verdes y animales (Figura 39), las relaciones filogenéticas colocan a todos los Euryarchaeota siempre asociados a bacterias del phylum Firmicutes, de la clase Clostridia, y a las Proteobacteria; en el caso de los eucariontes, las monocotiledóneas, musgos, helechos y algas verdes, están estrechamente relacionadas con cianobacterias y nitrospiras, mientras que los basidiomycetes, ascomycetes, poríferos y amibas, están relacionadas con bacteroidetes, gemmatimonadetes y bacterias del phylum Chlorobi.

Para los tioles metilados, analizamos a las únicas enzimas con actividad de metil transferasa detectables. Para el dimetilsulfuro, MtsA quien se encarga de transferir el grupo metilo, en este caso los análisis muestran una distribución amplia en varios miembros del dominio Bacteria, mientras que en Archaea está confinada a los phyla Euryarchaeota, *Candidatus Bathyarchaeota*, Lokiarchaeota y al grupo denominado unclassified Archaea, también está presente en eucariontes, específicamente en protistas, hongos, animales, algas verdes y plantas. La filogenia de esta enzima (Figura 40) muestra una mezcla importante entre arqueas metanógenas (pertenecientes a los phyla Euryarchaeota y *Candidatus Bathyarchaeota*), arqueas no metanógenas (de los phyla Lokiarchaeota y unclassified Archaea) y bacterias, por lo que la historia evolutiva de esta enzima no es muy clara. En caso de que el compuesto inicial sea metil mercaptopropionato, la enzima encargada es la MtpA, que en nuestros análisis muestra una distribución amplia en el dominio Bacteria, mientras que en Archaea solo miembros del phylum Euryarchaeota tienen la enzima. La filogenia de esta enzima (Figura 41) no muestra relaciones evolutivas claras, ya que en algunas ocasiones, los organismos que contienen la enzima y que pertenecen al phylum Euryarchaeota se agrupan con bacterias del phylum Firmicutes, aunque en otras ocasiones quedan como ramas separadas. En la tabla 8 se muestra un resumen de las presencias y ausencias de las enzimas que participan en la metanogénesis basada en compuestos metilados. La Figura Suplementaria 5 muestra agrupaciones de los organismos que contienen enzimas relacionadas con la metanogénesis metilotrófica y en ella se puede observar a *Bathyarchaeota* y *Verstraetearchaeota* junto a Euryarchaeota.

Tabla 7. Tabla que contiene un resumen de las enzimas que participan en la metanogénesis basada en compuestos metilados (metilotrónica). En ella se muestran el nombre de la enzima, el número de subunidades, el número asignado por la comisión enzimática (número E.C.), los genes que codifican para las diferentes enzimas y la reacción llevada a cabo.

Metanogénesis basada en compuestos metilados				
Metanol				
Enzima	Nº de subunidades	Número E.C. Función	Genes	Reacciones
Complejo metanol-CoM metiltransferasa	3	2.1.1.90 Transferasa y proteína corrinoide	mtaB	Metanol + coenzima M \rightleftharpoons metil-CoM + H ₂ O, una proteína [methyl-Co(III) proteína corrinoide metanol-especifica] + coenzima M \rightleftharpoons una proteína [Co(I) proteína corrinoide metanol-especifica] + metil-CoM + H ⁺ , metanol + una proteína [Co(I) proteína corrinoide metanol-especifica] + H ⁺ \rightarrow una proteína [metil-Co(III) proteína corrinoide metanol-especifica] + H ₂ O (Sauer, et al., 1997).
			mtaC (proteína corrinoide)	
		2.1.1.246 Transferasa	mtaA	
Metilaminas				
Monometilamina				
metilamina-proteína corrinoide Co-metiltransferasa	2	2.1.1.248 Transferasa	mtmB	Metilamina + a [Co(I) proteína corrinoide metilamina-especifica] + H ⁺ \rightarrow una proteína [metil-Co(III) proteína corrinoide metilamina-especifica] + amonio (Burke, S. A., y Krzycki, J. A., 1997).
			mtmC	
Dimethylamine				
dimetilamina-proteína corrinoide Co-metiltransferasa	2	2.1.1.249 Transferasa	mtbB	Dimetilamina + una proteína [Co(I) proteína corrinoide dimetilamina-especifica] + H ⁺ \rightarrow una proteína [methyl-Co(III) proteína corrinoide dimetilamina-especifica] + metilamina. (Ferguson, et al., 2000).
			mtbC	
Trimetilamina				
trimetilamina-proteína corrinoide Co-metiltransferasa	2	2.1.1.250 Transferasa	mttB	Trimetilamina + una proteína [Co(I) proteína corrinoide trimetilamina-especifica] + H ⁺ \rightarrow una proteína [methyl-Co(III) proteína corrinoide trimetilamina-especifica] + dimetilamina. (Ferguson, y Krzycki, J. A, 1997)
			mttC	
Paso compartido entre todas las Metilaminas (mono, di and trimetilamina)				
metilada [metilamina-	1	2.1.1.247 Transferasa	mtbA	[methyl-Co(III) proteína corrinoide metilamina-especifica] + CoM \rightarrow [Co(I)

proteína corrinoide específica]:coenzima M metiltransferasa				<p>proteína corrinoide metilamina-específica] + metil-CoM + H⁺ [metil-Co(III) proteína corrinoide dimetilamina-específica] + CoM → [Co(I) proteína corrinoide dimetilamina-específica] + metil-CoM + H⁺ [methyl-Co(III) proteína corrinoide trimetilamina-específica] + CoM → una proteína [Co(I) proteína corrinoide trimetilamina-específica] + metil-CoM + H⁺ (Burke, S. A., y Krzycki, J. A., 1997; Ferguson, y Krzycki, J. A., 1997; Ferguson, <i>et al.</i>, 2000).</p>
Tioles metilados				
dimetilsulfuro (DMS), metanetiol (MeSH) y metiltiopropanoato				
metiltiol:coenzima M metiltransferasa	2	2.1.1.251 Transferasa	mstA	<p>metano-tiol + [Co(I) proteína corrinoide metano-tiol-proteína corrinoide específica] → [metil-Co(III) proteína corrinoide metano-tiol-proteína corrinoide específica] + HS-3-(metiltiol) propanoato + [Co(I) metano-tiol-proteína corrinoide específica] + H⁺ ⇌ [metil-Co(III) metano-tiol-proteína corrinoide específica] + 3-mercaptopropanoato a [metil-Co(III) metano-tiol-proteína corrinoide específica] + CoM ⇌ [Co(I) metano-tiol-proteína corrinoide específica] + metil-CoM + H⁺ dimetil sulfido + [Co(I) metano-tiol-proteína corrinoide específica] + H⁺ ⇌ metano-tiol + [methyl-Co(III) metano-tiol-proteína corrinoide específica] (Tallant, <i>et al.</i>, 2001)</p>
			mstB	
metilmercaptopropionato (MMPA)				
3-(metiltio)propanoato:coenzima M metiltransferasa	2	2.1.1.251 Transferasa	mtpA	<p>3-(methylthio)propanoate + a [Co(I) methanethiol-specific corrinoid protein] + H⁺ ⇌ a [methyl-Co(III) methanethiol-specific corrinoid protein] + 3-mercaptopropanoate a [methyl-Co(III) methanethiol-specific corrinoid protein] + coenzyme M ⇌ a [Co(I) methanethiol-specific corrinoid protein] + methyl-CoM + H⁺ (Tallant, T. C. y Krzycki, J. A., 1997).</p>
			mtpC	
Paso compartido por todos los tipos de metanogénesis				
Metil-coenzima M reductasa	3	2.8.4.1	mcrA, mcrB y mcrG.	<p>Coenzima B + metil-CoM ⇌ heterodisulfuro CoB-CoM + metano. (Scheller, <i>et al.</i>, 2010).</p>

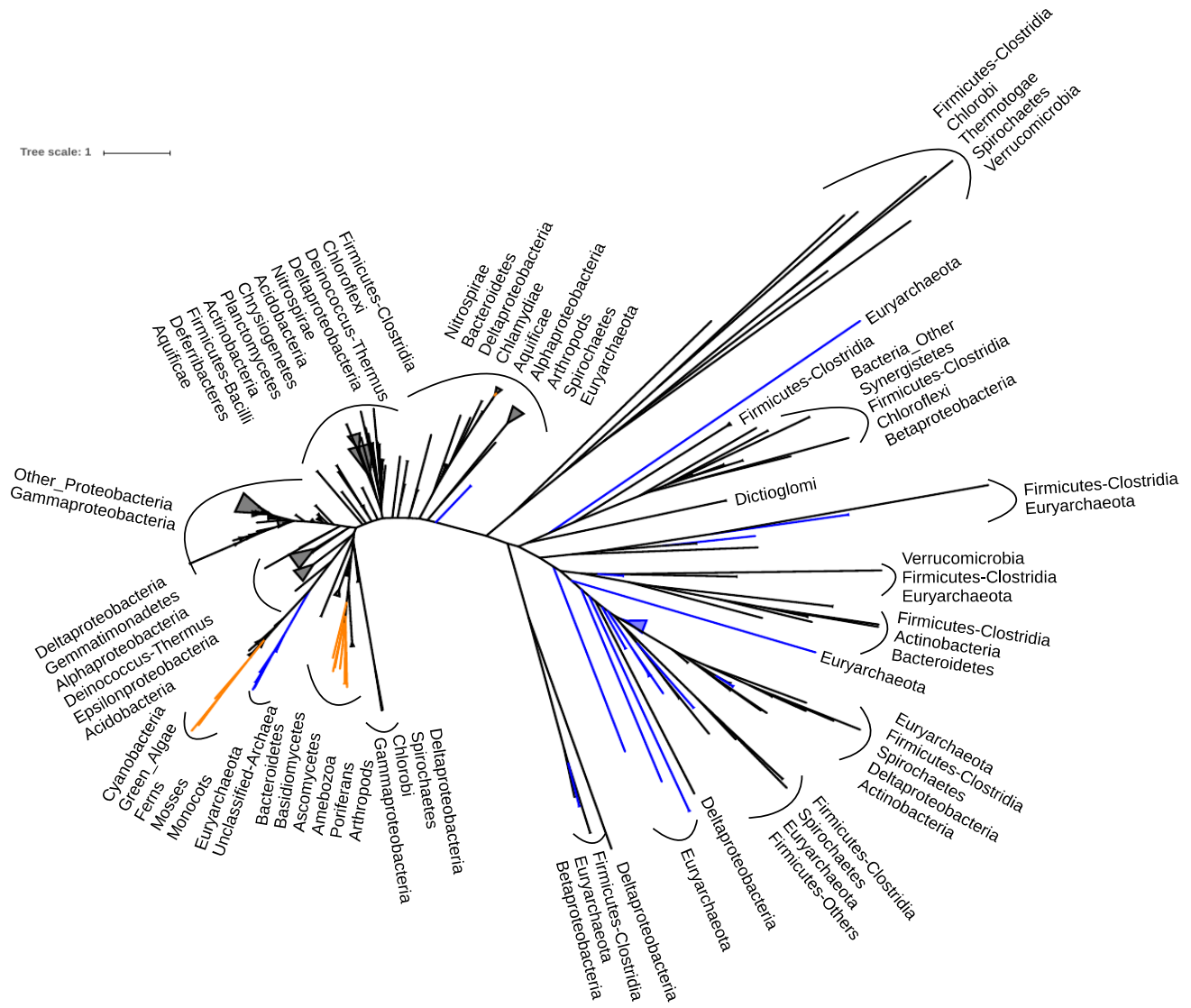


Figura 34. Filogenia de la subunidad A de la enzima metiltransferasa específica para metanol (MtaA). En donde se puede observar que todas las arqueas (ramas en color azul) que contienen la enzima se encuentran agrupadas con bacterias. Las ramas en color negro, pertenecientes al phylum Firmicutes, se asocian a las de la clase Clostridia, y con Proteobacterias, específicamente con Deltaproteobacterias; mientras que los eucariontes, ramas color anaranjado, aparecen asociados con cianobacterias y bacteroidetes.

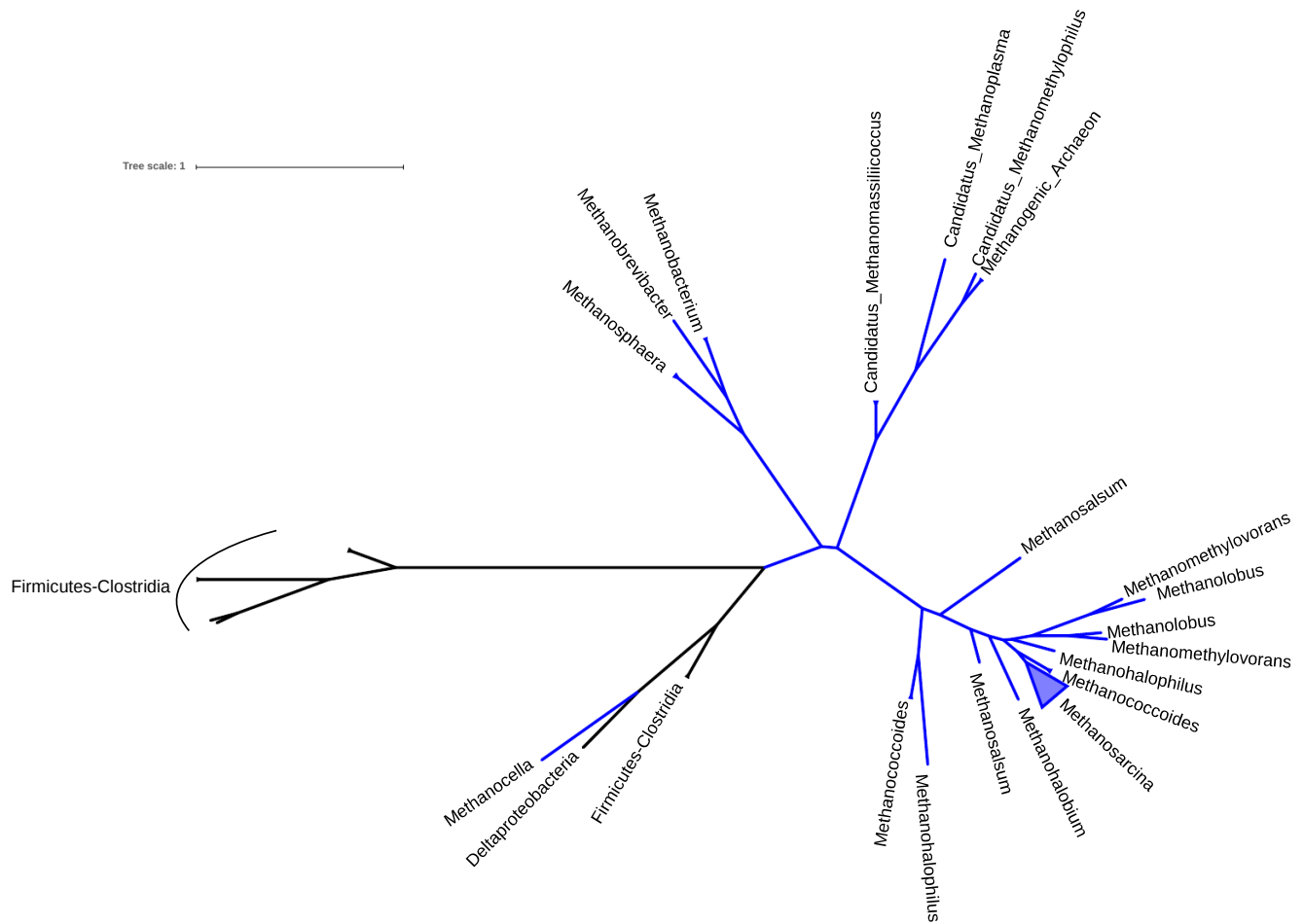


Figura 35. Filogenia de las subunidad B de la enzima metiltransferasa específica para metanol (MtaB). Todos los organismos que contienen la enzima y que pertenecen al dominio Archaea, son parte del phylum Euryarchaeota. Las bacterias que contienen la enzima pertenecen al phylum Firmicutes específicamente a la clase Clostridia y al phylum Proteobacteria de la clase Deltaproteobacteria.

Tabla 8. Presencias y ausencias de todas las enzimas con actividad de metil transferasa que participan en la metanogénesis metilotrófica.

Enzyme EC number	Methylotrophic Methanogenesis							
	Methanol	Monomet hylamine	Dimethyla mine	Trimethyla mine	All methylam ines	Dimethyl sulfide, methanet hiol and methylthio propanoat e	methylm rcaptopro pionate	
Gen	mtaB	mtaA	mtmB	mtbB1	mttB	mtbA	mtsA	mtpA
Animals-Vertebrates								
Animals-Arthropods								
Animals-Ascidians								
Animals-Cnidarians								
Animals-Poriferans								
Animals-Echinoderms								
Animals-Flatworms								
Animals-Lancelets								
Animals-Placozoans								
Plants-Monocots								
Plant-Ferns								
Plant-Mosses								
Plants-Eudicots								
Plants-Green algae								
Fungi-Ascomycetes								
Fungi-Basidiomycetes								
Protists-Amoebozoa								
Protists-Alveolates								
Protists-Stramenopiles								
Gammaproteobacteria – Enterobacteria								
Gammaproteobacteria – Others								
Betaproteobacteria								
Epsilonproteobacteria								
Deltaproteobacteria								
Alphaproteobacteria								
Other proteobacteria								
Firmicutes – Bacilli								
Firmicutes – Clostridia								
Firmicutes – Others								
Tenericutes								
Actinobacteria								
Cyanobacteria								
Chloroflexi								
Deinococcus-Thermus								
Armatimonadetes								
Unclassified								
Terrabacteria group								
Chlamydiae								
Verrucomicrobia								
Spirochaetes								
Acidobacteria								
Fibrobacteres								
Elusimicrobia								
Fusobacteria								
Gemmatimonadetes								
Synergistetes								
Planctomycetes								
Bacteroidetes								
Chlorobi								
Aquificae								
Thermotogae								
Caldiserica								
Chrysiogenetes								
Defemibacteres								
Dictyoglomi								
Nitrospirae								
Thermodesulfobacteria								
Bacteria-Other								
Unclassified Bacteria								
Euryarchaeota								
Crenarchaeota								
Thaumarchaeota								
Nanoarchaeota								
Korarchaeota								
Lokiarchaeota								
Bathyarchaeota								
Unclassified Archaea								

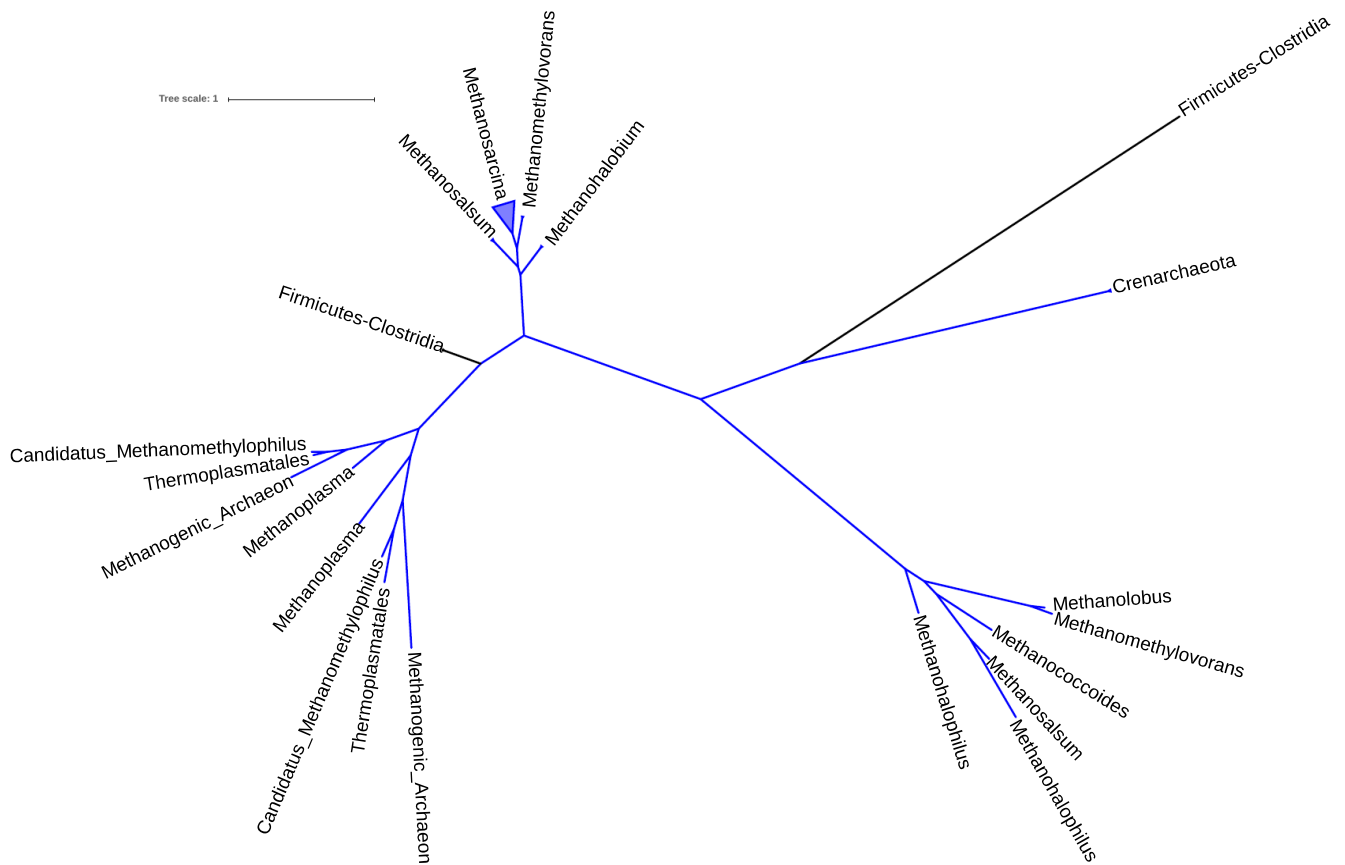


Figura 36. Filogenia de la enzima metiltransferasa específica de monometilamina MtmB, todas las ramas en color azul pertenecen a organismos del dominio Archaea, específicamente al phylum Euryarchaeota; las ramas de las únicas bacterias que contienen la enzima se encuentran en color negro y todas pertenecen a bacterias del phylum Firmicutes, de la clase Clostridia.

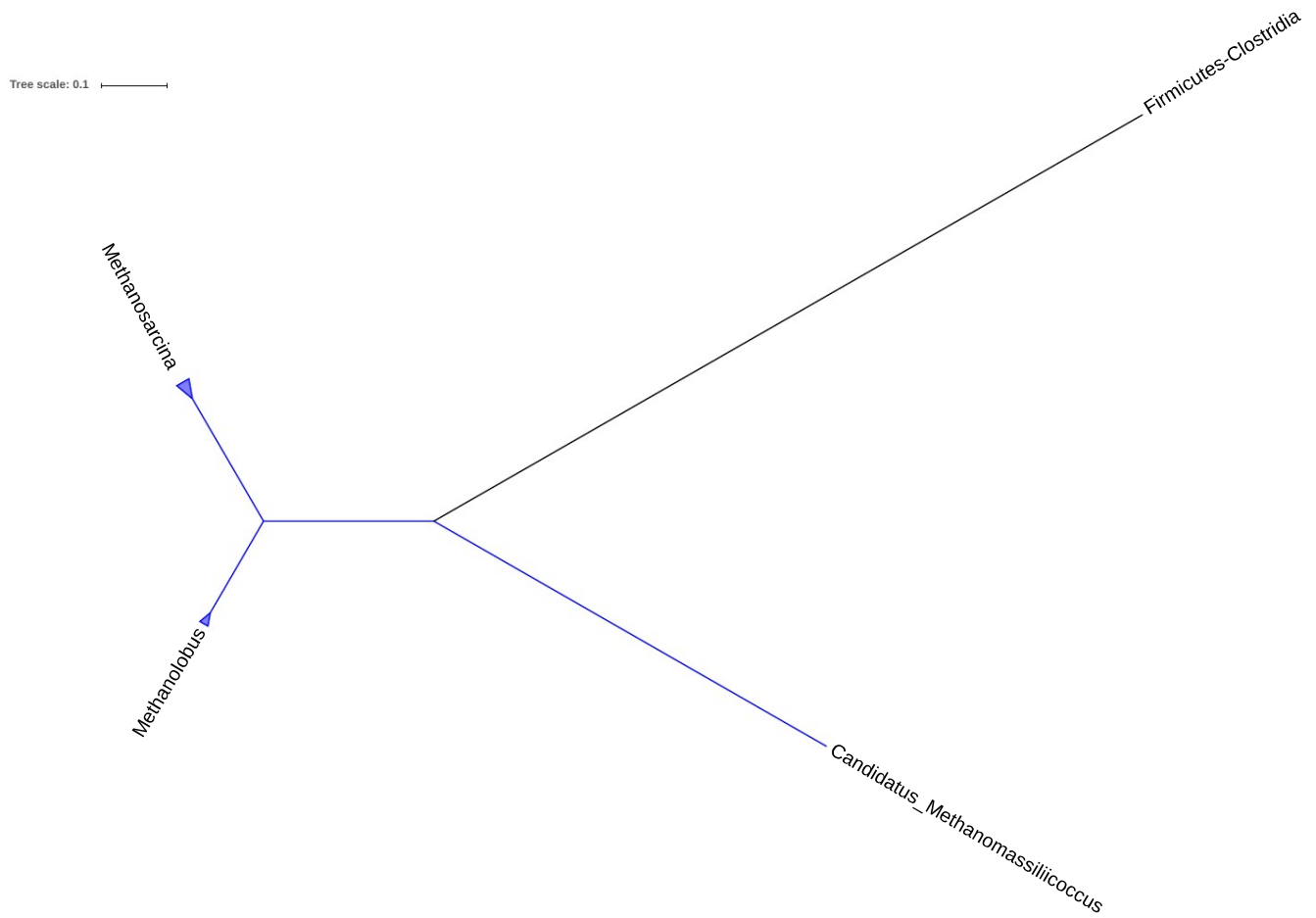


Figura 37. Filogenia de la enzima metiltransferasa específica de dimetilamina MtbB, en color azul se encuentran las arqueas que tienen dicha enzima, mientras que en color negro se encuentran las bacterias, organismos pertenecientes a los clostridiales son los únicos que tienen la enzima en bacterias, mientras que en el caso de las arqueas, *Methanosarcina*, *Methanoblobus* y *candidatus Methanomassiliicoccus* tienen la enzima.

Tree scale: 1

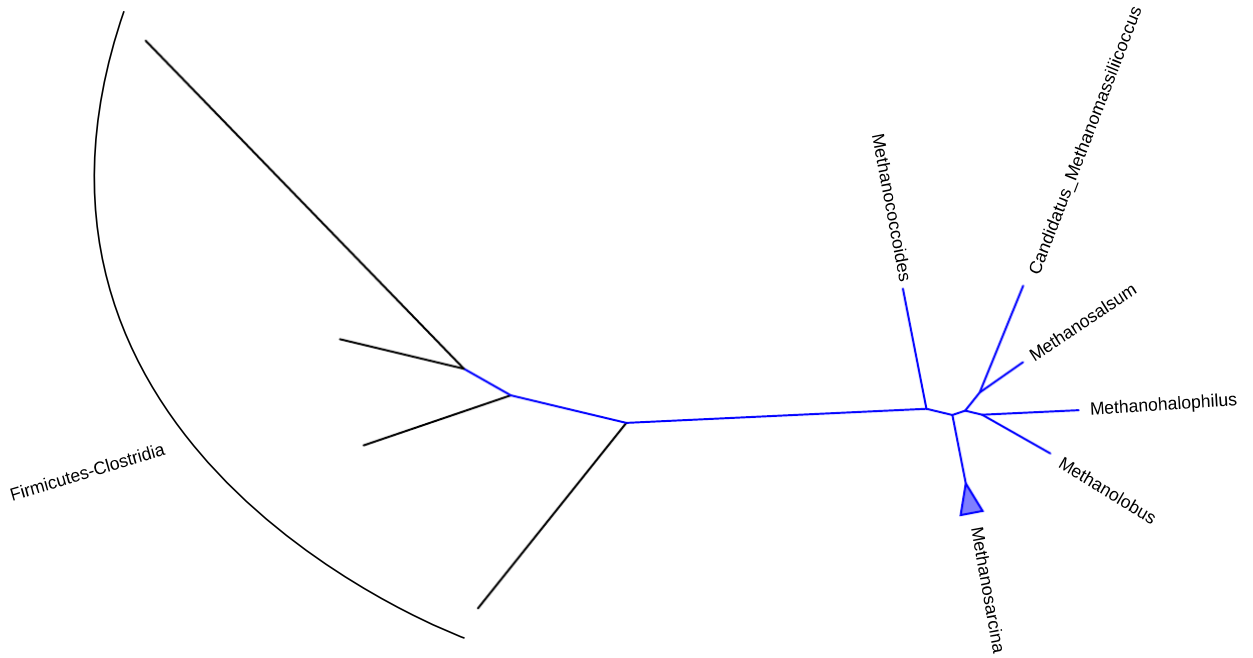


Figura 38. Filogenia de la enzima metiltransferasa específica de trimetilamina MttB, en donde se puede apreciar en color azul las ramas de organismos pertenecientes al dominio Archaea, todas pertenecen al phylum Euryarchaeota; mientras que en color negro se observan las ramas de organismos pertenecientes al dominio Bacteria, todas pertenecen al phylum Firmicutes, a la clase Clostridia.

Tree scale: 1

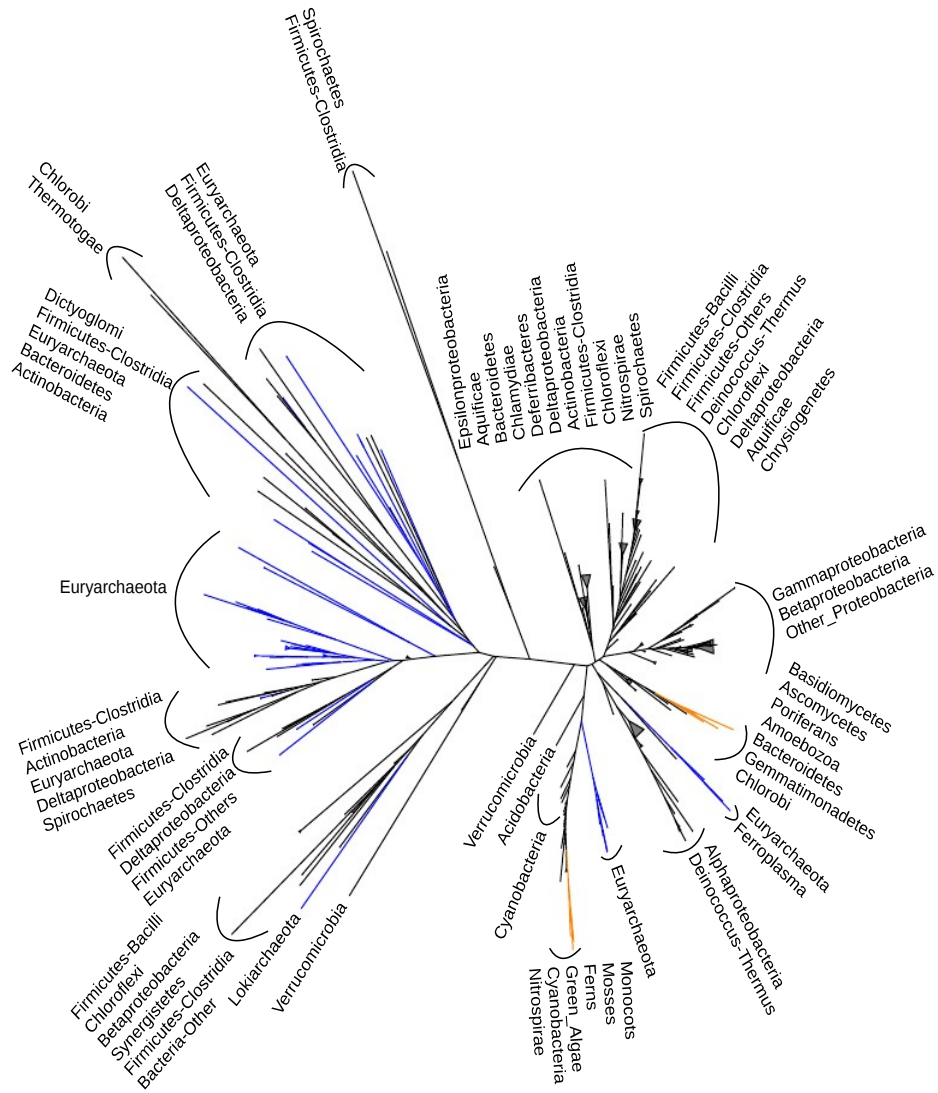


Figura 39. Filogenia de la enzima metiltransferasa compartida entre todas las metilaminas MtbA, las ramas en color anaranjado corresponden a organismos pertenecientes al dominio Eukarya; en azul las pertenecientes al dominio Archaea y en negro los del dominio Bacteria. En todos los casos, las ramas pertenecientes a Archaea son de los phyla Euryarchaeota y Lokiarchaeota, y las Euryarchaeota siempre se encuentran asociadas a bacterias del phylum Firmicutes de la clase Clostridia o bien al phylum Proteobacteria.

Tree scale: 1

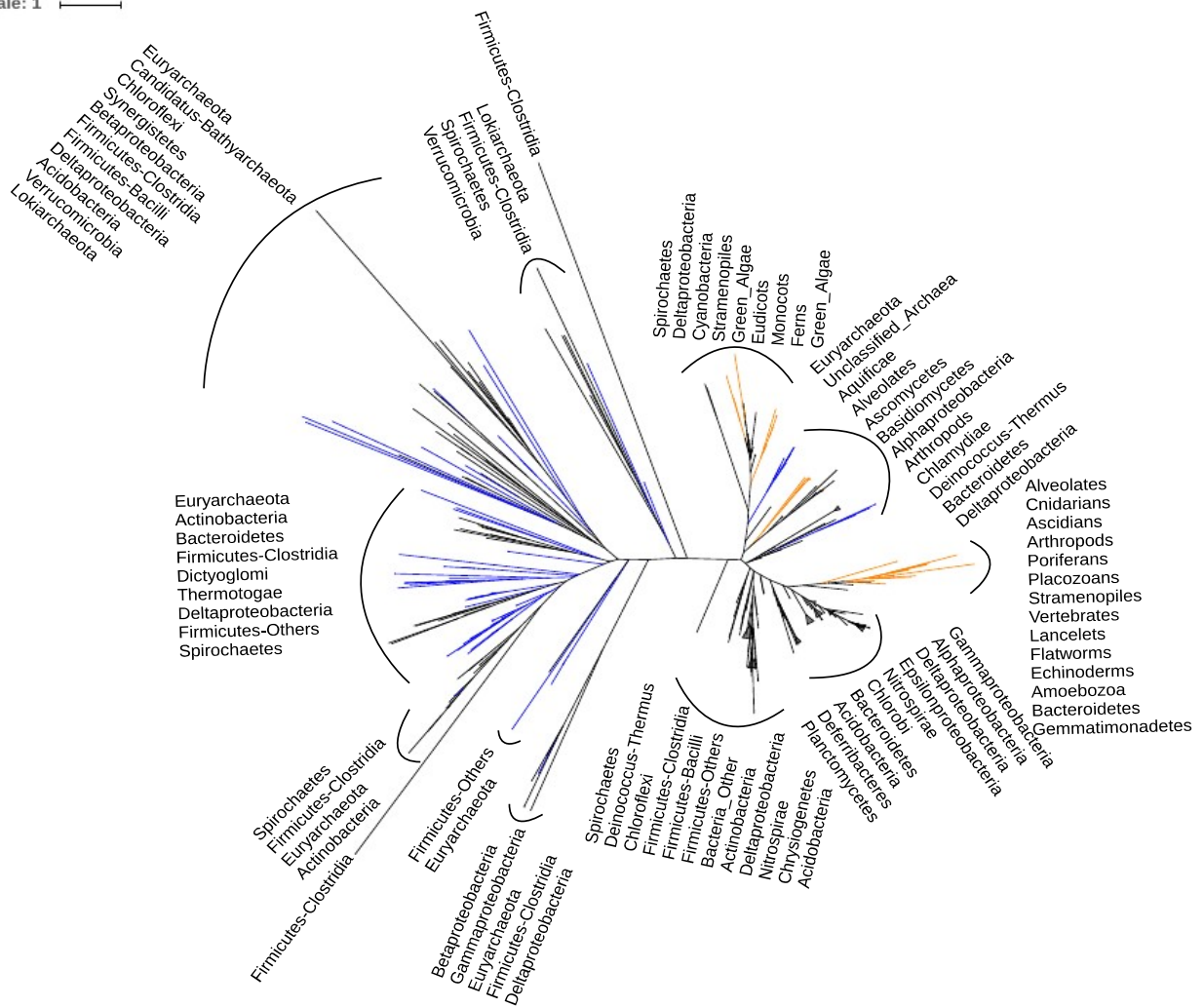


Figura 40. Filogenia de la enzima metiltransferasa específica de dimetilsulfuro MtsA, en color anaranjado se encuentran las ramas de organismos pertenecientes a Eukarya, en azul las ramas de organismos pertenecientes a Archaea y en negro las ramas de los organismos pertenecientes a Bacteria.

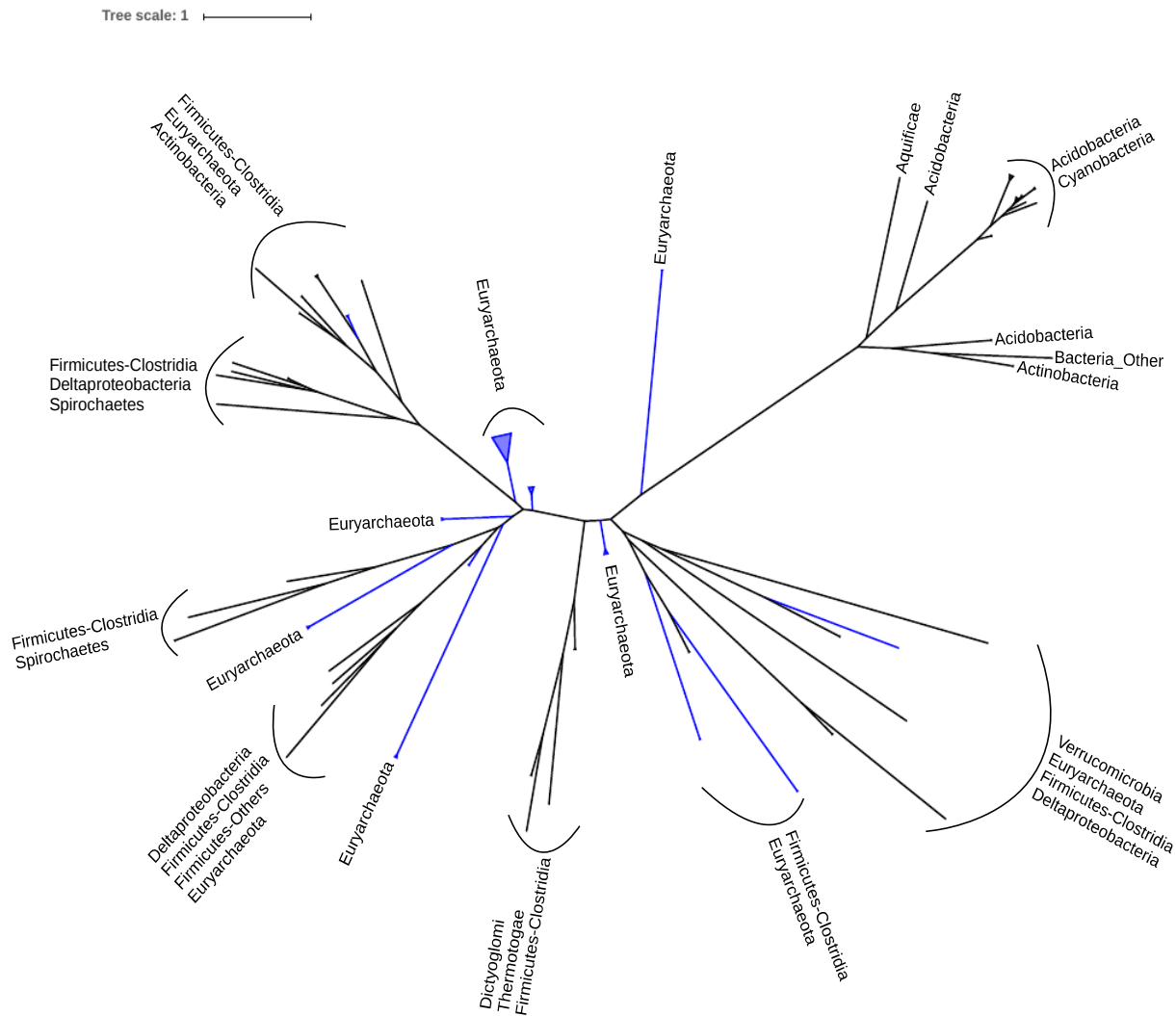


Figura 41. Filogenia de la enzima metiltransferasa específica de metilpropionato MtpA, las ramas que pertenecen al dominio Archaea se presentan en color azul, mientras que las que pertenecen al dominio Bacteria están en color negro. En esta figura se puede observar que las Arqueas que contienen la enzima, pertenecientes al phylum Euryarchaeota, en algunas ocasiones se encuentran agrupadas con bacterias del phylum Firmicutes, mientras que en otras ocasiones están separadas por completo de cualquier otra rama.

X Discusión

X.1 Metanogénesis Hidrogenotrófica y Wood-Ljungdahl pathway, posible origen y evolución.

Como muestran los resultados, las enzimas involucradas en los primeros cinco pasos de la metanogénesis hidrogenotrófica, que también corresponde a la rama metilo de la ruta de reducción de la acetil coenzima A, o de Wood-Ljungdahl (WL) pathway arqueana (Figura 2A), tienen una distribución que va más allá de solo organismos metanógenos, pudiéndose encontrar en diversas bacterias (ej. Firmicutes-Clostridia, Planctomicetes y Proteobacterias de las clases Alfareobacteria, Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria) y en arqueas no metanogénicas (ej. Lokiarchaeota y Archaeoglobales), como los organismos pertenecientes al orden Archaeoglobales (Figura 25). A partir de los análisis de las filogenias se sugiere que partes de la ruta, o subunidades de las enzimas, han sido transferidas de manera horizontal a organismos que posiblemente utilicen dichas enzimas, o subunidades, en otros procesos metabólicos diferentes a la rama metilo de la ruta de reducción de la acetil coenzima A o a la metanogénesis en cualquiera de sus variantes. Un ejemplo de esto puede ser la subunidad E de la isoenzima con tungsteno, la formil metanofurano deshidrogenasa (FwdE), la cual se ha reportado que además de participar en la metanogénesis hidrogenotrófica, está conservada en organismos acetógenos; en estos organismos aún no se sabe su función, pero se ha propuesto que podría actuar como una proteína de unión a DNA (**Shin et al., 2014**).

Nuestros resultados apoyan la idea de que la metanogénesis hidrogenotrófica es más antigua que las otras dos variantes (**Bapteste et al., 2005**), por la distribución de las enzimas que participan en las distintas rutas en los diferentes organismos metanógenos.

Los primeros cinco pasos de la metanogénesis hidrogenotrófica están compartidos con la ruta de Wood-Ljungdahl (**Martin y Russell, 2007**), referida en este trabajo como la rama metilo de la ruta de WL arqueana (Figuras 2 y 25). La ruta de WL arqueana y la ruta WL bacteriana (homoacetogénesis) difieren en número de reacciones y en las enzimas que participan en cada reacción. Trabajos anteriores (**Sousa et al., 2014**) han demostrado que las enzimas que participan en las ramas metilo del WL arqueana y bacteriana no son homólogas, incluso si se realiza el análisis a nivel de estructura terciaria, ya que sólo comparten un plegamiento TIM-barrel pero no son ortólogos estructurales. Esto debido a que no comparten dominios estructurales, este fenómeno es un ejemplo de convergencia evolutiva de casi toda una ruta metabólica completa. Esto sugiere que la forma de transferir un grupo metilo hasta reducirlo a metano, o hasta convertirlo en parte de otro compuesto como la acetil coenzima A o el acetato, surgió al menos dos veces en la historia evolutiva, utilizando diferentes grupos de enzimas que no comparten ancestría común. Lo anterior nos lleva a pensar que ni la rama

metilo de la ruta de WL bacteriana, por tanto la acetogénesis, ni la rama metilo de la WL arqueana, y por tanto la metanogénesis, pudieron haber estado presentes en el último ancestro común (LCA) (Figura 42) sino que ambas rutas surgieron de manera independiente en cada dominio celular.

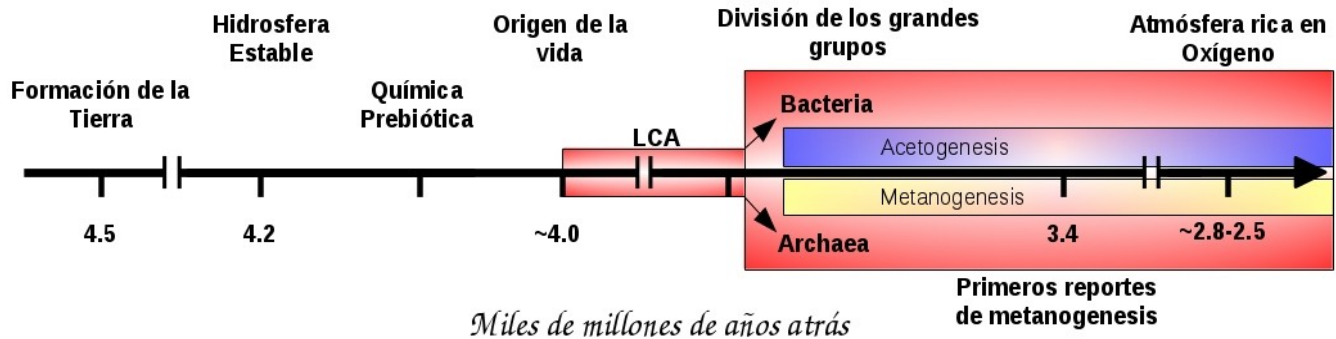


Figura 42. Línea del tiempo en donde se hace énfasis en que ni la metanogénesis (cuadro amarillo) ni la acetogénesis (cuadro azul), estuvieron presentes en el último ancestro común (LCA), sino que son una aparición posterior a la divergencia de los dominios Bacteria y Archaea.

Se ha observado la producción de metano de manera abiótica puede ocurrir en condiciones donde la presión y temperaturas son muy elevadas, como las que ofrecen ambientes como los manantiales y las fuentes hidrotermales.

Este proceso se lleva a cabo ya sea gracias a la descomposición de la biomasa presente en dichos ambientes o a un proceso denominado serpentinización (**Rusell et al., 2010**), el cual se da en ambientes rocosos específicos formados por peridotita que contienen el mineral olivina sobre el manto oceánico o incluso por debajo de las placas tectónicas (**Sleep et al., 2011**). Por estas y otras razones, como la simpleza de las reacciones químicas para lograr transferir un grupo metilo hasta llegar a metano, se ha propuesto que la metanogénesis podría ser uno de los metabolismos más antiguos en aparecer junto con la acetogénesis (**Sousa et al., 2013**), tal vez con implicaciones en las capacidades metabólicas del último ancestro común LUCA (**Martin et al., 2016; Weiss et al., 2016**). Otras posturas colocan a este metabolismo como parte del repertorio metabólico del último ancestro común del dominio Archaea (LACA) (**Borrel et al., 2016; Williams et al., 2017**); desde esta perspectiva se piensa que la distribución actual restringida solo al phylum Euryarchaeota y a miembros de los phyla Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota se debe a múltiples pérdidas de estas habilidades metabólicas en los organismos no metanógenos pertenecientes al dominio Archaea (**Borrel et al., 2016**).

Adicionalmente se ha sugerido que LACA era capaz de fijar carbón de manera autotrófica a través de la ruta de reducción de acetil coenzima A (**Williams et al., 2017**). A pesar de que gran parte de las enzimas que participan en la primer parte de la metanogénesis hidrogenotrófica, compartidas con la

rama metilo de WL arqueana, se encuentran ausentes en muchos de los linajes arqueanos que no tienen habilidades de producción de metano (este trabajo; **Williams et al., 2017**), se sigue argumentando que el último ancestro del dominio Archaea era metanógeno. Nuestros resultados no soportan esas conclusiones, ya que si bien hay organismos fuera del phylum Euryarchaeota potencialmente capaces de realizar metanogénesis (ej. Bathyarchaeota (**Evans et al., 2015**) y Vertraetearchaeota (**Vanwonterghem et al., 2016**)), lo harían reduciendo compuestos monocarbonados metilados, un tipo de metabolismo que difiere en gran medida de la metanogénesis basada en CO₂ e H₂. Por lo tanto, proponemos que la presencia de genes característicos de la metanogénesis puede ser el resultado de una transferencia horizontal de las enzimas claves de la metanogénesis (Mcr) hacia estos nuevos phyla, o bien que sea resultado de la pérdida masiva de los genes de la metanogénesis (basada en CO₂ e H₂) en estos linajes y en los linajes no metanógenos. Por tanto los resultados aquí presentados no apoyan ni la idea de que organismos cercanos LUCA fueran metanógenos ni de que el último ancestro común de Archaea (LACA) fuera metanógeno. Lo que los resultados sugieren es que la metanogénesis surgió antes de la divergencia del phylum Euryarchaeota. Si bien hubo pérdidas de este metabolismo en algunos organismos, fue dentro de este phylum y no en los otros phyla arqueanos de los cuales no encontramos toda la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo ni metanogénesis, ni fijación de carbono por medio de WL (al menos la rama metilo arqueana) (Figura Suplementaria 3). Los recientes descubrimientos de organismos metanógenos estrechamente relacionados con la clase Halobacteriales (**Sorokin et al., 2017**) apoyan la idea de la pérdida de la metanogénesis en organismos dentro del phylum Euryarchaeota, idea que ya se había propuesto para el orden Archaeoglobales (**Baptiste et al., 2005**) y el orden Halobacteriales (**Nelson-Sathi et al., 2012**), ya que mientras que los Archaeoglobales retienen casi completamente la rama metilo de WL (este trabajo, **Borrel et al., 2016**), parece ser que los Halobacteriales tuvieron múltiples pérdidas a lo largo de su historia evolutiva (**Nelson-Sathi et al., 2012**), perdiendo casi por completo las enzimas de la ruta de fijación autotrófica de WL arqueano (este trabajo), probablemente debido a la adquisición de genes para un estilo de vida aerobio heterotrófico (**Williams et al., 2017**). Así mismo, si se realiza un agrupamiento de los organismos que contienen las enzimas que participan en la metanogénesis hidrogenotrófica es posible observar que Euryarchaeota queda agrupado con Bathyarchaeota y algunos miembros de Asgard Archaea (Figura Suplementaria 3), esto podría ser debido a posibles transferencias de las enzimas en cuestión entre los organismos descritos.

X.2 Metanogénesis Acetoclástica

Nuestros resultados muestran que las enzimas acetato quinasa (Ack) y fosfotransacetilasa (Pta) tienen una distribución como la que encontraron **Fournier y Gogarten en 2008** y apoyan la idea de

que ambos genes fueron transferidos de *Clostridia* a *Methanosarcina*. Adicionalmente al trabajo de Fournier y Gogarten, nuestros análisis contienen proteomas de organismos pertenecientes al dominio Eukarya y esto nos proporciona una idea de la amplia distribución de estas dos enzimas en los tres dominios de la vida. Los resultados muestran que los organismos del género *Methanosaeta* no tienen los genes que codifican para Ack o Pta; lo cual es congruente con reportes previos que describen que *Methanosaeta* usa la enzima Acetil CoA Sintetasa (ACS) formadora de AMP (no analizada en este trabajo) para activar el acetato y convertirlo en acetil coenzima A. Esta enzima suple las funciones de Ack y Pta (**Jetten et al., 1989**), de la cual sabemos que comparte motivos y características del sitio activo con las enzimas Acs formadora de ADP y con Ack. Se ha propuesto que Ack podría ser producto de una duplicación y posterior divergencia del gen que codifica para la subunidad α de la enzima Acs formadora de ADP (**Barnhart et al., 2015**). Los resultados presentados en este trabajo muestran que Pta está presente en organismos del género *Methanobacterium* (Figura 27). Estos organismos están reportados como metanógenos hidrogenotróficos, lo que nos hace pensar que probablemente esta enzima está realizando otras funciones que no están involucradas con la metanogénesis acetoclástica, por ejemplo, la fijación de carbono de manera autotrófica por medio de la ruta de reducción de la acetil coenzima A.

La enzima central de esta ruta metabólica, la CODH/ACS clase II (CdhA-E), se caracteriza por participar en la escisión de la acetil-CoA en un grupo metilo, un grupo carboxilo y coenzima A (**Lessner 2009**), a diferencia de las CODH/ACS de la clase I (AcsA-F, CooC) que son formadoras de acetil-CoA y que participan en la rama carbonilo de la ruta autotrófica de fijación de carbón Wood-Ljungdahl (**Wood et al., 1986**) típica de bacterias homoacetógenas. Los resultados muestran que algunas subunidades tienen un origen arqueano (Figuras 30 a 32), mientras que otras pudieron haber tenido un origen bacteriano y posteriormente ser transferidas a arqueas metanógenas. Tal es el caso de la subunidad CdhA (Figura 29) que tiene la actividad de oxidación del grupo carbonilo, una actividad importante de esta enzima bifuncional. La distribución de la subunidad CdhC es casi exclusivamente arqueana, esta subunidad tiene una actividad contraria a la de acetil-CoA sintetasa, ya que en lugar de sintetizar acetil-CoA la escinde. Otros trabajos han sugerido que las CODH/ACS de clase I son de un origen más antiguo que las CODH/AC's de clase II (**Lindahl y Chang, 2001**), si esto es cierto, entonces la CODH/ACS que participa en la rama carbonilo del Wood-Ljungdahl es anterior a la CODH/ACS que participa en la metanogénesis acetoclástica, por tanto la ruta de Wood-Ljungdahl es anterior a la de metanogénesis acetoclástica.

Los resultados de cada una de las subunidades de la CODH/ACS obtenidos en este trabajo, permiten proponer una historia evolutiva que: 1) describe la presencia de una CODH/ACS ancestral, compuesta tal vez por solo dos subunidades, que muy probablemente ya se encontraba en el repertorio del último ancestro común, 2) sugiere que la CODH/ACS tipo II, específica de la metanogénesis acetoclástica, pudo haber tenido un origen en una rama del phylum Euryarchaeota,

específicamente la rama que da origen a organismos del orden Methanosarcinales, o bien, haber surgido antes de la divergencia del phylum Euryarchaeota (Figura 43), esto basándose en los resultados de la distribución de esta enzima (Tabla Suplementaria 2).

X.3 Metanogénesis Metilotrónica

De las tres variantes de la metanogénesis, la metanogénesis metilotrónica es la que tiene más variedad de sustratos. Cada metiltransferasa es diferente dependiendo del sustrato inicial (ver introducción IV.4.3 Metanogénesis basada en compuestos metilados (metilotrónica) y Tabla 7). La simpleza en cuanto a número de reacciones de este tipo de metabolismo (en donde solo son necesarias las metiltransferasas específicas de cada compuesto y la metil coenzima M reductasa, Figura 2C)) en principio podría sugerir que este tipo de metanogénesis fue de los primeros metabolismos de producción de metano en surgir de manera muy temprana en la evolución del dominio Archaea. Sin embargo la distribución de las enzimas que participan en este tipo de metanogénesis (Figura 2C y Tabla 8) no apoya esta idea, ya que sólo organismos pertenecientes a los órdenes *Methanosarcina* y algunas especies de *Methanosphaera* son capaces de llevar a cabo este tipo de metanogénesis (Ferry 1993; Lessner 2009), así como los nuevos organismos descritos *Methanomassiliicoccales* (Dridi et al., 2012; Paul et al., 2012) y *Methanonatronarchaeia* (Sorokin et al., 2017) y posiblemente los phyla de reciente descubrimiento Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota (Evans et al., 2015 y Vanwonterghem et al., 2016).

Esta ruta de la metanogénesis se parece más a una ruta de salvamento en la que diferentes compuestos metilados son integrados al metabolismo para la obtención de energía. Para esto los compuestos metilados debieron estar disponibles en el medio y posteriormente ser introducidos a la células y de esta forma ser integrados rápidamente al metabolismo energético de las arqueas que son capaces de realizar esta variante de la metanogénesis.

Los resultados mostrados en este trabajo proveen información importante sobre la distribución de las enzimas de esta ruta en los tres dominios de la vida (Tabla 8), en el caso de MtaB y MtA podemos encontrarlas a ambas en Deltaproteobacteria y en Firmicutes de la clase Clostridia. La presencia de todas las enzimas para el aprovechamiento de las metilaminas en Firmicutes de la clase Clostridia y la del aprovechamiento de tioles metilados, en donde MtsA está bastante distribuida en Eucariontes, Unclassified Archaea, Lokiarchaeota y Bathyarchaeota, y MtpA en bacterias homoacetogénicas de los phyla Firmicutes (clase Clostridia y Others), Acidobacteria y Spirochaetes, y en bacterias de los phyla Proteobacteria (clase Deltaproteobacteria), Actinobacteria, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Aquificae, Thermotogae, Dictyoglomi y Bacteria-Other. Hasta el momento no hay información de los procesos metabólicos en los que pudieran estar participando estas enzimas en los organismos antes

detallados, ni si esta información pudiera dar indicios de la posible evolución de estas enzimas, ya que las filogenias (ver resultados) muestran ramas que pertenecen a organismos del dominio Archaea entremezcladas con ramas de organismos pertenecientes al dominio Bacteria, las agrupaciones de los organismos que contienen a las enzimas de la metanogénesis metilotrófica muestran una clara relación de los organismos de los phylum Bathyarchaeota, Verstraetearchaeota y Firmicutes-Clostridia con organismos del phylum Euryarchaeota (Figura Suplementaria 5), no se puede descartar una posible transferencia horizontal de las enzimas de la metanogénesis de Euryarchaeota hacia estos organismos (Spang et al., 2017).

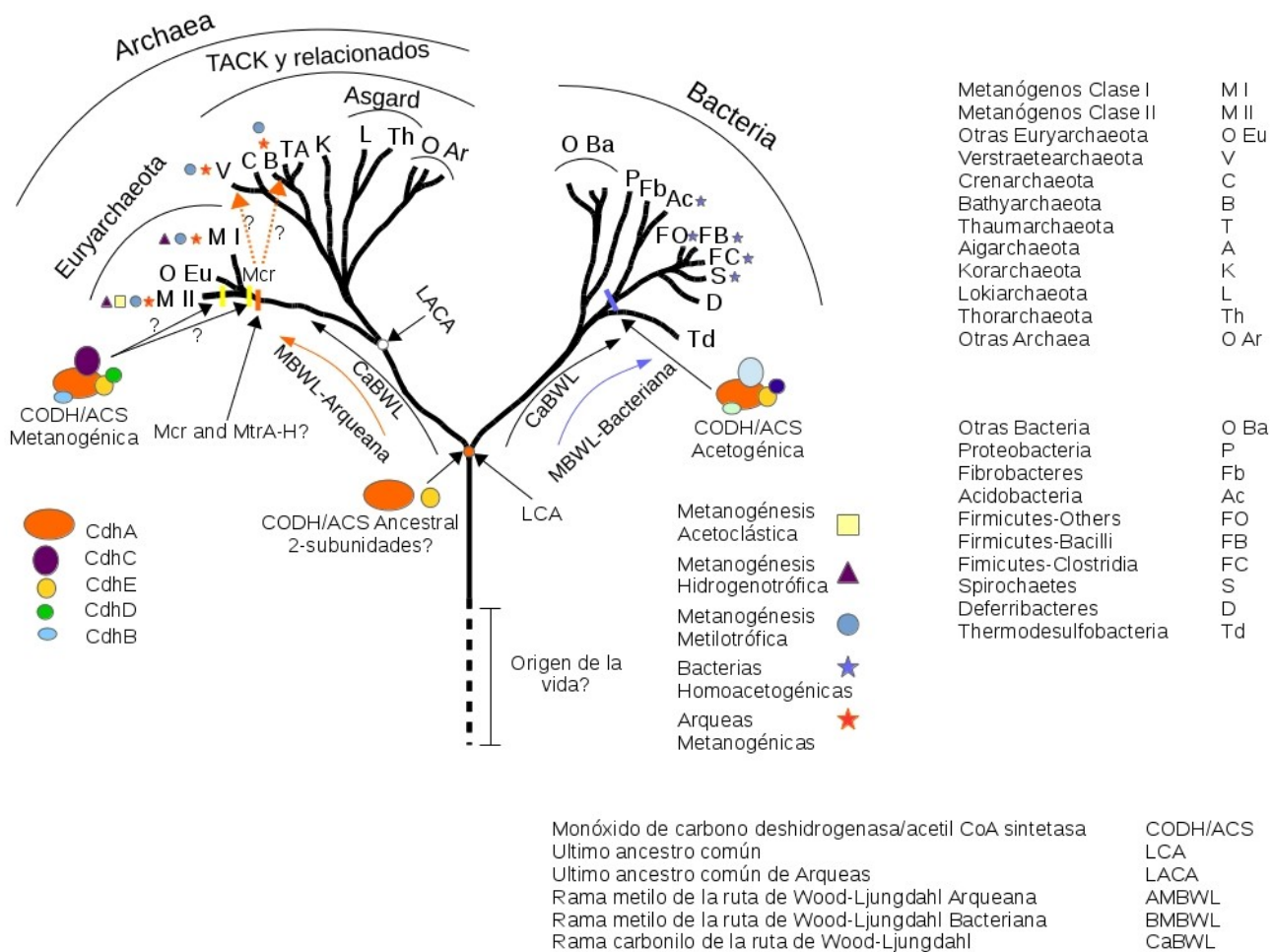


Figura 43. Representación gráfica de un árbol de la vida, en donde se señala el posible origen de la CODH/ACS ancestral (círculo anaranjado sobre la rama principal del árbol). Por tanto el posible origen de la rama carbonilo de la ruta de Wood-Ljungdahl (CaBWL), el origen probable de la rama metilo arqueana (MBWL-Arqueana) y bacteriana (MBWL-Bacteriana) de manera independiente, justo después de la divergencia de los dos dominios; también se destaca el posible origen de la CODH/ACS utilizada en la metanogénesis acetoclástica (rectángulo amarillo) en la rama que contiene a los metanógenos clase II o bien en la rama que dará origen todo Euryarchaeota y el finalmente el origen probable de las enzimas Mtr y Mcr (rectángulo anaranjado), indicando a la vez el posible el origen de la metanogénesis.

XI Conclusiones

- Los primeros cinco pasos de la metanogénesis hidrogenotrófica (también conocidos como rama metilo de Wood-Ljungdahl arqueana) se encuentran bien distribuidos en los grupos de arqueas descritos como metanógenos, así como en organismos no metanógenos pertenecientes al dominio Archaea (ej. Archaeoglobales).
- Las enzimas responsables de los primeros cinco pasos compartidos por la ruta de Wood-Ljungdahl arqueana y la metanogénesis hidrogenotrófica también se encuentran distribuidos en representantes del dominio Bacteria (ej. Spirochaetes, Planctomicetes, Firmicutes, Proteobacteria, entre otros).
- Las metiltransferasa (MtrA-H) y metil coenzima M reductasa (Mcr) son enzimas específicas de organismos pertenecientes al dominio Archaea y al phylum Euryarchaeota, pudiéndose encontrar en organismos pertenecientes a las clase I y II de metanógenos y en el caso de la Mcr también presente en los phyla Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota.
- Al igual que Baptiste *et al.*, 2005, sugerimos que la metanogénesis hidrogenotrófica es la variante de la metanogénesis más antigua, esto debido a los patrones de distribución de las enzimas que se utilizan en cada paso metabólico y que se comparten con la rama metilo de la ruta autotrófica de fijación de carbono de reducción de la acetil coenzima A, Wood-Ljungdahl arqueana y a la evolución de la CODH/ACS tipo II utilizada en la metanogénesis acetoclástica.
- Sugerimos que no existe evidencia suficiente para pensar que el último ancestro común (LUCA) tuviera habilidades metanogénicas, ni que realizara fijación de manera autotrófica por vía de la ruta de Wood-Ljungdahl.
- Tampoco hay evidencia lo suficientemente sólida para suponer que el último ancestro del dominio Archaea (LACA) tuviera capacidades metanogénicas.
- La evidencia que se tiene hasta el momento parece indicar que el metabolismo de la metanogénesis surgió en Archaea como una innovación del phylum Euryarchaeota y que la presencia de enzimas típicas de la metanogénesis (metiltransferasas y metil coenzima M reductasa) en los phyla de reciente descubrimiento, Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota, podría deberse a una transferencia de las enzimas en cuestión a esos phyla ya mencionados (esta hipótesis es tentativa y tiene que probarse).
- La metanogénesis acetoclástica es una invención de algunos organismos pertenecientes al orden Methanosarcinales, para ello se requirió de la actividad de la CODH/ACS tipo II, de la cual, parte de esta enzima multimérica tiene su origen dentro del phylum Euryarchaeota y

parece ser una invención más reciente con respecto a la batería enzimática de la metanogénesis hidrogenotrófica.

- Las enzimas que transfieren el grupo metilo (metiltransferasas) involucradas en la metanogénesis metilotrófica tienen una distribución muy amplia en bacterias, eucariotas y arqueas no metanógenas, posiblemente transferidas entre los organismos que las poseen y participando en distintas rutas metabólicas diferentes a la metanogénesis metilotrófica.
- La metanogénesis metilotrófica parece ser una especie de ruta de salvamento en la que se integran rápidamente compuestos monocarbonados metilados al metabolismo energético.
- Si bien se ha hipotetizado un escenario en el que muchos organismos pertenecientes al dominio Archaea perdieron las habilidades metabólicas de la metanogénesis, la distribución encontrada para cada uno de los componentes de las distintas rutas metanogénicas no apoyan esta idea.

XII Perspectivas

- Un análisis evolutivo a mayor detalle de las enzimas clave de la metanogénesis (Metil transferasas y metil coenzima M reductasa) a nivel de estructura terciaria podría dar más detalles sobre la evolución de esta ruta metabólica y sus variantes.
- Un estudio preciso sobre la posible transferencia horizontal de genes entre organismos de los phyla Euryarchaeota, Bathyarchaeota y Vertraetearchaeota podría aclarar de una vez por todas si ocurrió transferencia entre estos grupos o si pudo haber múltiples pérdidas de este metabolismo en organismos no metanogénicos pertenecientes al dominio Archaea.
- Un análisis pangenómico de organismos metanógenos podría aclarar los eventos de pérdidas y/o ganancias de los elementos genéticos implicados en el metabolismo de la metanogénesis.
- El estudio de la rama metilo bacteriana de Wood-Ljungdahl (que corresponde a los primeros seis pasos de la homoacetogénesis) podría evidenciar las relaciones evolutivas de dichas enzimas y tal vez dar polaridad a la antigüedad de la ruta de acetogénesis con respecto a la metanogénesis.
- El análisis de las metiltransferasas específicas de cada sustrato en la ruta de metanogénesis metilotrófica podría evidenciar las relaciones evolutivas de estas con otras metiltransferasas y otras transferasas en general.
- La comparación de la evolución de las enzimas CODH/ACS clase I y clase II es importante para aclarar la antigüedad de los metabolismos de fijación autotrófica de carbono, por medio de la reducción de la acetil coenzima A, tanto en Bacteria como en Archaea.

XIII Material Suplementario

Publicaciones relacionadas con el término metanogénesis

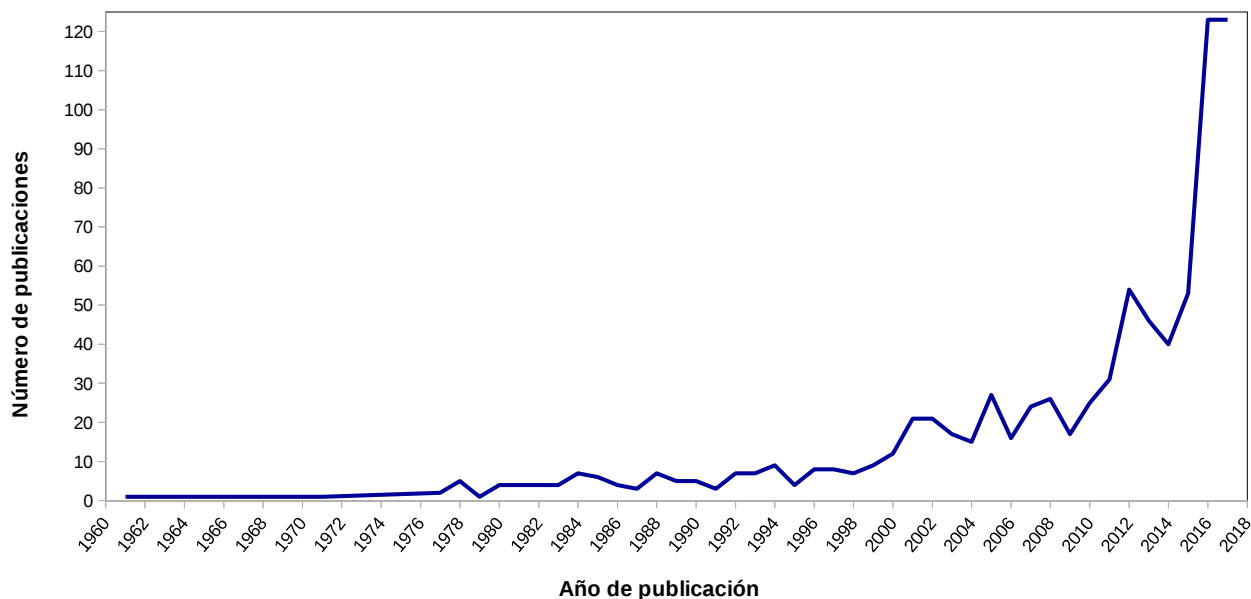


Figura suplementaria 1. Número de publicaciones por año, relacionadas con el tema metanogénesis. Se puede observar que en los últimos dieciséis años ha habido un incremento significativo.

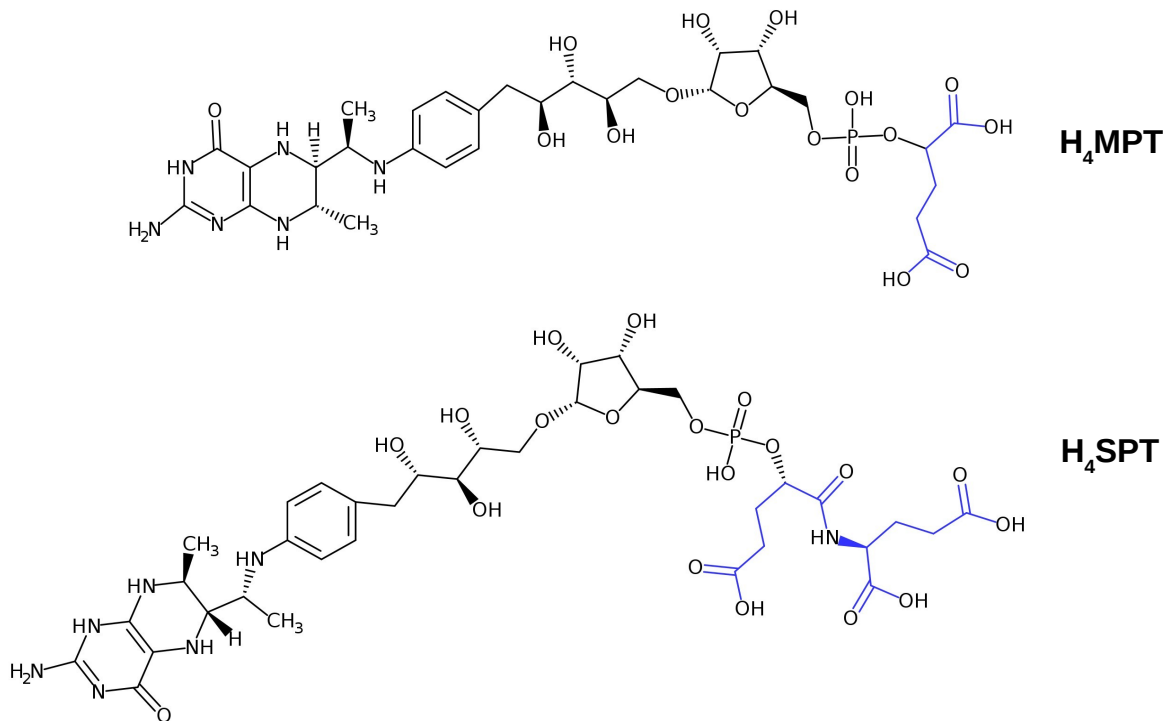


Figura suplementaria 2. Estructura química de la tetrahidrometanopterina (H₄MPT) y la tetrahidrosarcinopterina (H₄SPT), ambas coenzimas difieren en la porción glutamilo adicional, las diferencias entre ambas estructuras están resaltadas en color azul.

Tabla suplementaria 1. Modelo evolutivo utilizado en cada uno de los análisis realizados en este trabajo, cada modelo fue determinado automáticamente, en función del alineamiento múltiple de secuencias, con ayuda del programa bioinformático Iqtree.

fmdA	LG+G4
fmdB	LG+G4
fmdC	LG+G4
fmdD	LG+G4
fmdE	LG+G4
fmdF	WAG+G4
fr	LG+I+G4
mch	LG+I+G4
mtD	LG+I+G4
hmd	LG+G4
mer	LG+F+G4
mtrA	LG+I+G4
mtrB	LG+I+G4
mtrC	LG+F+I+G4
mtrD	LG+F+I+G4
mtrE	LG+F+I+G4
mtrF	mtZOA+G4
mtrG	LG+G4
mtrH	LG+I+G4
mcrA	LG+F+I+G4
mcrB	LG+F+I+G4
mcrG	LG+I+G4
ack	LG+I+G4
pta	LG+G4
cdhA1 α	LG+F+I+G4
cdhC1 β	LG+F+I+G4
cdhD1 δ	LG+G4
cdhE1 γ	LG+I+G4
cdhB1 ϵ	LG+G4
mtaB	LG+F+I+G4
mtaA	LG+G4
mtmB	LG+G4
mtbB1	LG+I
mttB	LG+G4
mtbA	LG+G4
mtsA	LG+G4
mtpA	LG+G4

Metanogénesis
Hidrogenotrófica

Metanogénesis
Acetoclástica

Metanogénesis
Metilotrófica

Tabla suplementaria 2. Tabla de presencias y ausencias de las subunidades que conforman a la CODH/ACS tipo II específica de la metanogénesis acetoclástica, en organismos del phylum Euryarchaeota.

Enzima Número EC	Complejo acetyl-CoA decarbonilasa/sintasa				
Gen	cdhA1 α	cdhC1 β	cdhD1 δ	cdhE1 γ	cdhB1 ϵ
Archaeoglobales					
Halobacteriales					
Methanobacteriales					
Methanocellales					
Methanococcales					
Methanomicrobiales					
Methanopyrales					
Methanosarcinales					
Thermococcales					
Thermoplasmatales					

Metanogénesis Hidrogenotrófica

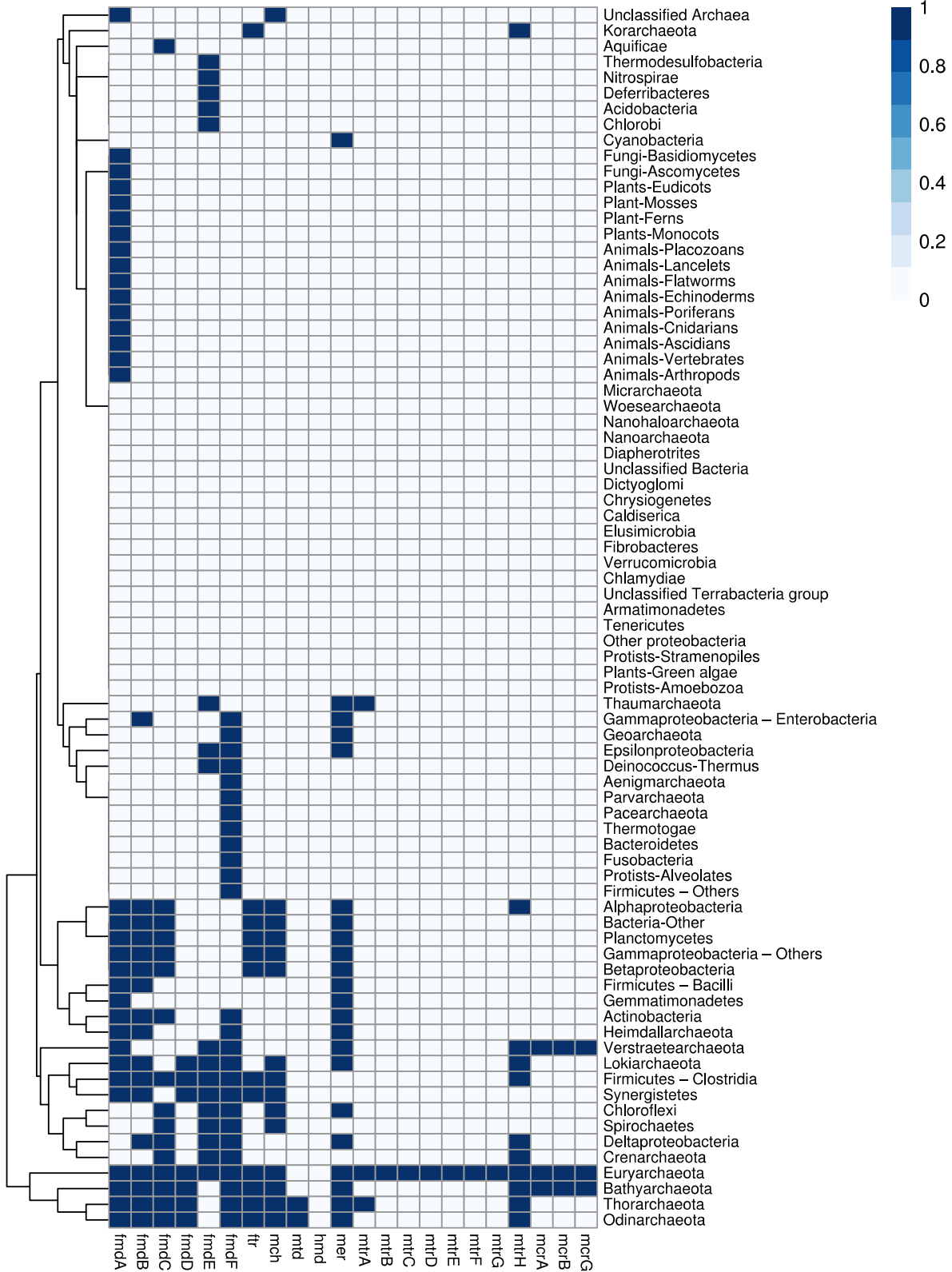


Figura suplementaria 3. Hetamap con clusterización basado en la tabla de presencia-ausencias de la metanogénesis hidrogenotrófica (Tabla 3).

XIV Referencias bibliográficas

- Acharya, P., Warkentin, E., Ermler, U., Thauer, R. K., & Shima, S. (2006). The structure of formylmethanofuran: Tetrahydromethanopterin formyltransferase in complex with its coenzymes. *Journal of Molecular Biology*, 357(3), 870–879.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.
- Bapteste, É., Brochier, C., & Boucher, Y. (2005). Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea*, 1(2002), 353–363.
- Barber, R. D. (2007). Methanogenesis: ecology. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)* 1–8.
- Barnhart, E. P., McClure, M. A., Johnson, K., Cleveland, S., Hunt, K. a., & Fields, M. W. (2015). Potential Role of Acetyl-CoA Synthetase (acs) and Malate Dehydrogenase (mae) in the Evolution of the Acetate Switch in Bacteria and Archaea. *Scientific Reports*, 5(August), 12498.
- Battistuzzi, F. U., Feijao, A., & Hedges, S. B. (2004). A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evolutionary Biology*, 4, 44.
- Becerra, A., Rivas, M., García-ferris, C., Lazcano, A., & Peretó, J. (2014). A phylogenetic approach to the early evolution of autotrophy: the case of the reverse TCA and the reductive acetyl-CoA pathways. *International Microbiology*, 17, 91–97.
- Becher, B., Müller, V., & Gottschalk, G. (1992). N5-methyl-tetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase of Methanosarcina strain Gö1 is an Na(+)-translocating membrane protein. *Journal of Bacteriology*, 174(23), 7656–7660.
- Berg, I. a, Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B. & Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(6), 447–60.
- Berger, S., Welte, C., & Deppenmeier, U. (2012). Acetate activation in Methanosaeta thermophila: Characterization of the key enzymes pyrophosphatase and acetyl-CoA synthetase. *Archaea*, 2012.
- Bonacker, L. G., Baudner, S., Morschel, E., Bocher, R., & Thauer, R. K. (1993). Properties of the two isoenzymes of methyl-coenzyme M reductase in Methanobacterium thermoautotrophicum. *European Journal of Biochemistry*, 217(2), 587–595.
- Borrel, G., O'Toole, P. W., Harris, H. M. B., Peyret, P., Brugère, J.-F., Gribaldo, S. (2013). Phylogenomic Data Support a Seventh Order of Methylotrophic Methanogens and Provide Insights into the Evolution of Methanogenesis. *Genome Biology and Evolution*, 5(10), 1769–1780.
- Borrel, G., Adam, P. S., & Gribaldo, S. (2016). Methanogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association. *Genome Biology and Evolution*, 8(6), 1706–1711.

- Burke, S. A., & Krzycki, J. A. (1995). Involvement of the “A” isozyme of methyltransferase II and the 29- kilodalton corrinoid protein in methanogenesis from monomethylamine. *Journal of Bacteriology*, 177(15), 4410–4416.
- Burke, S. A., & Krzycki, J. A. (1997). Reconstitution of Monomethylamine:Coenzyme M Methyl Transfer with a Corrinoid Protein and Two Methyltransferases Purified from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16570–16577.
- Burke, S. A., Lo, S. L., & Krzycki, J. A. (1998). Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine. *Journal of Bacteriology*, 180(13), 3432–3440.
- Can, M., Armstrong, F. A., and Ragsdale, S. W. (2014). Structure, function, and mechanism of the nickel metalloenzymes, CO dehydrogenase, and acetyl-CoA synthase. *Chemical reviews*, 114(8):4149-4174.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972–1973.
- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C. A., Holland, T. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Kubo, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D. S., Weerasinghe, D., Zhang, P., and Karp, P. D. (2014). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome databases. *Nucleic acids research*, 42(Database issue):D459-D471.
- Costa, K. C., & Leigh, J. a. (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 29(1), 70–75.
- Donnelly, M. I., Escalante-Semerena, J. C., Rinehart, K. L., and Wolfe, R. S. (1985). Methenyl-tetrahydromethanopterin cyclohydrolase in cell extracts of methanobacterium. *Archives of biochemistry and biophysics*, 242(2):430-439.
- Donnelly, M. I. and Wolfe, R. S. (1986). The role of formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase in methanogenesis from carbon dioxide. *The Journal of biological chemistry*, 261(35):16653-16659.
- Doukov, T. I., Iverson, T. M., Seravalli, J., Ragsdale, S. W., & Drennan, C. L. (2002). A Ni-Fe-Cu Center in a Bifunctional Carbon Monoxide Dehydrogenase/ Acetyl-CoA Synthase. *Science*, 298(5593), 567–572.
- Dridi, B., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Raoult, D., & Drancourt, M. (2012). *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(8), 1902–1907.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–7.
- Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M., & Thauer, R. K. (1997). Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science (New York, N.Y.)*, 278(November), 1457–1462.
- Evans, P. N., Parks, D. H., Chadwick, G. L., Robbins, S. J., Orphan, V. J., Golding, S. D., & Tyson, G. W. (2015). Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science*, 350(6259), 434–438.

- Ferguson, D. J., Krzycki, J. A., & Grahame, D. A. (1996). Specific roles of methylcobamide:coenzyme M methyltransferase isozymes in metabolism of methanol and methylamines in *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(9), 5189–5194.
- Ferguson, D. J., & Krzycki, J. A. (1997). Reconstitution of trimethylamine-dependent coenzyme M methylation with the trimethylamine corrinoid protein and the isozymes of methyltransferase II from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Bacteriology*, 179(3), 846–852.
- Ferguson, D. J., Gorlatova, N., Grahame, D. A., & Krzycki, J. A. (2000). Reconstitution of Dimethylamine:Coenzyme M Methyl Transfer with a Discrete Corrinoid Protein and Two Methyltransferases Purified from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 29053–29060.
- Ferry, J. G. (1992). Methane from acetate. *Journal of Bacteriology*, 174(17), 5489–5495.
- Ferry, J. G. (1993). *Methanogenesis Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. Springer-Science + Business Media, B. V.
- Ferry, J. G. (1997). Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila*. *BioFactors (Oxford, England)*, 6(1), 25–35.
- Ferry, J. G. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(1), 13–38.
- Ferry, J. G. (2010). How to make a living by exhaling methane. *Annual Review of Microbiology*, 64, 453–73.
- Finn, R. D., Clements, J., & Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue), W29-37.
- Fournier, G. P., & Gogarten, J. P. (2008). Evolution of acetoclastic methanogenesis in *Methanosarcina* via horizontal gene transfer from cellulolytic *Clostridia*. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1124–1127.
- Fu, H., & Metcalf, W. W. (2015). Genetic Basis for Metabolism of Methylated Sulfur Compounds in *Methanosarcina* Species. *Journal of Bacteriology*, 197(8), 1515–1524.
- Fuchs, G. (2011). Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life? *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 631–658.
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996) SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.*, 12, 543-548..
- Gao, B., & Gupta, R. S. (2007). Phylogenomic analysis of proteins that are distinctive of Archaea and its main subgroups and the origin of methanogenesis. *BMC Genomics*, 8, 86.
- Gärtner, P., Ecker, A., Fischer, R., Linder, D., Fuchs, G., and Thauer, R. K. (1993). Purification and properties of n5-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme m methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *European journal of biochemistry*, 213(1):537-545.
- Gencic, S., & Grahame, D. A. (2003). Nickel in subunit β of the Acetyl-CoA Decarbonylase/Synthase Multienzyme Complex in Methanogens: Catalytic properties and evidence for a binuclear Ni-Ni site. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 6101–6110.

- Gottschalk, G., & Thauer, R. K. (2001). The Na⁺-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1505(1), 28–36.
- Gong, W., Hao, B., Wei, Z., Ferguson, D. J., Tallant, T., Krzycki, J. a, & Chan, M. K. (2008). Structure of the alpha2epsilon2 Ni-dependent CO dehydrogenase component of the Methanosarcina barkeri acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 9558–9563.
- Graham, D. E., & White, R. H. (2002). Elucidation of methanogenic coenzyme biosyntheses: from spectroscopy to genomics. *Natural Product Reports*, 19(2), 133–147.
- Gribaldo, S., & Brochier-Armanet, C. (2006). The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1470), 1007–22.
- Gorrell, A., Lawrence, S. H., and Ferry, J. G. (2005). Structural and kinetic analyses of arginine residues in the active site of the acetate kinase from methanosarcina thermophila. *The Journal of biological chemistry*, 280(11):10731-10742.
- Guy, L., & Ettema, T. J. G. (2011). The archaeal “TACK” superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 19(12), 580–587.
- Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., Butterfield, C. N., HERNSDORF, A. W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D. A., Finstad, K. M., Amundson, R., Thomas, B. C & Banfield, J. F. (2016). A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*, 1(5), 16048.
- Hügler, M., & Sievert, S. M. (2011). Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Annual Review of Marine Science*, 3, 261–89.
- Ingram-Smith, C., Gorrell, A., Lawrence, S. H., Iyer, P., Smith, K., & Ferry, J. G. (2005). Characterization of the acetate binding pocket in the Methanosarcina thermophila acetate kinase. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2386–2394.
- Jetten, M. S. M., Stams, A. J. M., & Zehnder, A. J. B. (1989). Isolation and characterization of acetyl coenzyme A synthetase from Methanotrix soehngenii. *J. Bacteriol.*, 171(10), 5430–5435.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 199–205.
- Klein, A. R., Fernández, V. M., and Thauer, R. K. (1995). H₂-forming N₅,N₁₀-methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase: mechanism of h₂ formation analyzed using hydrogen isotopes. *FEBS letters*, 368(2):203-206.
- Lessner, D. J. (2009). Methanogenesis Biochemistry. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, (1), 1–11.
- Letunic, I., & Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1), 127–128.

- Lindahl, P. A., & Chang, B. (2001). The evolution of acetyl-CoA synthase. *Orig Life Evol Biosph*, 31(4–5), 403–434.
- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 171–189.
- Martin, W., & Russell, M. J. (2007). On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1486), 1887–1925.
- Martin, W., Weiss, M., Neukirchen, S., Nelson-Sathi, S., & Sousa, F. (2016). Physiology, phylogeny, and LUCA. *Microbial Cell*, 3(12), 451–456.
- Maupin-Furlow, J. and Ferry, J. G. (1996). Characterization of the cdhD and cdhE genes encoding subunits of the corrinoid/iron-sulfur enzyme of the CO dehydrogenase complex from methanosarcina thermophila. *Journal of bacteriology*, 178(2):340-346.
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & Von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188–1195.
- Nelson-Sathi, S., Dagan, T., Landan, G., Janssen, A., Steel, M., McInerney, J. O., Deppenmeier, U. & Martin, W. F. (2012). Acquisition of 1,000 eubacterial genes physiologically transformed a methanogen at the origin of Haloarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20537–42.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.
- Offre, P., Spang, A., & Schleper, C. (2013). Archaea in biogeochemical cycles. *Annual Review of Microbiology*, 67(June), 437–57.
- Paul, K., Nonoh, J. O., Mikulski, L., & Brune, A. (2012). “Methanoplasmatales,” thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8245–8253.
- Peretó, J. (2012). Out of fuzzy chemistry: from prebiotic chemistry to metabolic networks. *Chemical Society Reviews*, 41(16), 5394–5403.
- Petitjean, C., Deschamps, P., López-García, P., Moreira, D., & Brochier-Armanet, C. (2015). Extending the conserved phylogenetic core of archaea disentangles the evolution of the third domain of life. *Molecular Biology and Evolution*, 32(5), 1242–1254.
- Pomper, B. K., Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E., & Thauer, R. K. (1999). A methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolase and a methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase in Methylobacterium extorquens AM1. *European Journal of Biochemistry*, 261(2), 475–480.
- Rospert, S., Breitung, J., Ma, K., Schwörer, B., Zirngibl, C., Thauer, R. K., Linder, D., Huber, R., Stetter, K. O. (1991). Methyl-coenzyme M reductase and other enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂ in the extreme thermophile Methanopyrus kandleri. *Archives of Microbiology*, 156, 49–55.

- Rospert, S., Linder, D., Ellermann, J., & Thauer, R. K. (1990). Two Genetically Distinct Methyl-Coenzyme M Reductases in Methanobacterium Thermoautotrophicum Strain Marburg and Deltah. *Eur J Biochem*, 194(3), 871–877.
- Russell, M. J., Hall, A. J., & Martin, W. (2010). Serpentinization as a source of energy at the origin of life. *Geobiology*, 8(5), 355–371.
- Sauer, K., Harms, U., Thauer, R. K., & (1997). Methanol: coenzyme M methyltransferase from Methanosarcina barkeri Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1. *Eur. J. Biochem*, 243, 670–677.
- Sauer, K., & Thauer, R. K. (1999). Methanol:coenzyme M methyltransferase from Methanosarcina barkeri - Substitution of the corrinoid harbouring subunit MtaC by free cob(II)alamin. *European Journal of Biochemistry*, 261(3), 674–681.
- Scheller, S., Goenrich, M., Boecher, R., Thauer, R. K., and Jaun, B. (2010). The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 465(7298):606-608.
- Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M. S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R. K., Ermler, U. (2008). The Crystal Structure of [Fe]-Hydrogenase Reveals the Geometry of the Active Site. *Science*, 321(5888), 572–575.
- Shin, J., Song, Y., Jeong, Y., & Cho, B.-K. (2016). Analysis of the Core Genome and Pan-Genome of Autotrophic Acetogenic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 7(September).
- Sleep, N., Bird, D., & Pope, E. (2011). Serpentinite and the dawn of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1580), 2857–2869.
- Smith, K. S., & Ingram-Smith, C. (2007). Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends in Microbiology*, 15(4), 150–155.
- Sorokin, D. Y., Makarova, K. S., Abbas, B., Ferrer, M., Golyshin, P. N., Galinski, E. A., Ciordia, S., Mena, M. C., Merkel, A. Y., Wolf, Y. I., van Loosdrecht, M. C. M. & Koonin, E. V. (2017). Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. *Nature Microbiology*, 2(May), 17081.
- Sousa, F. L., & Martin, W. F. (2014). Biochemical fossils of the ancient transition from geoennergetics to bioenergetics in prokaryotic one carbon compound metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(7), 964–981.
- Sousa, F. L., Thiergart, T., Landan, G., Nelson-Sathi, S., Pereira, I. a C., Allen, J. F., Lane, N, Martin, W. F. (2013). Early bioenergetic evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 368(1622), 20130088.
- Stadman, E. R. (1952). The purification and properties of phosphotransacetylase. *The Journal of biological chemistry*, 196(2):527-534.
- Thauer, R. K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W., & Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 579–591.

- Tallant, T. C. and Krzycki, J. A. (1997). Methylthiol:coenzyme m methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*, an enzyme of methanogenesis from dimethylsulfide and methylmercaptopropionate. *Journal of bacteriology*, 179(22):6902-6911.
- Tallant, T. C., Paul, L., & Krzycki, J. A. (2001). The MtsA Subunit of the Methylthiol:Coenzyme M Methyltransferase of *Methanosarcina barkeri* Catalyses Both Half-reactions of Corrinoid-dependent Dimethylsulfide: Coenzyme M Methyl Transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4485–4493.
- te Brömmelstroet, B. W., Hensgens, C. M., Geerts, W. J., Keltjens, J. T., van der Drift, C., and Vogels, G. D. (1990). Purification and properties of 5,10-methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of bacteriology*, 172(2):564-571
- Ueno, Y., Yamada, K., Yoshida, N., Maruyama, S., & Isozaki, Y. (2006). Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era. *Nature*, 440(7083), 516–519.
- van Beelen, P., Labro, J. F. A., Keltjens, J. T., Geerts, W. J., Vogels, G. D., Laarhoven, W. H., Guijt, W. & Haasnoot, C. A. G. (1984). Derivatives of methanopterin, a coenzyme involved in methanogenesis. *European Journal of Biochemistry*, 139(2), 359–365.
- Vanwonterghem, I., Evans, P. N., Parks, D. H., Jensen, P. D., Woodcroft, B. J. 5, Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2016). Methylophilic methanogenesis discovered in the novel archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nature*, (October), 1–9.
- Vorholt, J. A. and Thauer, R. K. (1997). The active species of 'CO₂' utilized by formylmethanofuran dehydrogenase from methanogenic archaea. *European journal of biochemistry*, 248(3):919-924.
- Wagner, T., Ermler, U., & Shima, S. (2016). The methanogenic CO₂ reducing-and-fixing enzyme is bifunctional and contains 46 [4Fe-4S] clusters. *Science*, 354(6308), 114–117.
- Weiss, M. C., Sousa, F. L., Mrnjavac, N., Neukirchen, S., Roettger, M., Nelson-sathi, S., & Martin, W. F. (2016). The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nature Microbiology*, (July), 1–8.
- Whitman, W. B., Bowen, T. L., & Boone, D. R. (2006). *The Methanogenic Bacteria. Prokaryotes Vol. 3.*
- Williams, T. A., Szöllősi, G. J., Spang, A., Foster, P. G., Heaps, S. E., Boussau, B., Ettema, T. J. G. & Embley, T. M. (2017). Integrative modeling of gene and genome evolution roots the archaeal tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201618463.
- Wood, H. G., Ragsdale, S. W., & Pezacka, E. (1986). The acetyl-CoA pathway: a newly discovered pathway of autotrophic growth. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(1), 14–18.