



Parte superior de una chimenea de casi 12 metros de altura situada a 2352 metros de profundidad. Se ve el brazo robótico del vehículo operado por control remoto. Foto: Centre for Geobiology/University of Bergen, Norway.

# Los antepasados arqueanos de eucariotas ya no son tan escurridizos

## Resumen

El origen de los eucariotas es uno de los problemas más difíciles de la biología evolutiva tal es así que hasta se llegó a plantear la desgraciada explicación de complejidad irreductible. La reconstrucción del genoma del último ancestro común eucariótico (LECA) reveló que se trataría de un organismo altamente complejo con una variedad de características avanzadas pero sin intermediarios evolutivos detectables que puedan explicar su origen. Sin embargo, el análisis genómico de diversas arqueas mostró versiones ancestrales de sistemas típicos de eucariontes, como por ejemplo el citoesqueleto de actina y mecanismos mediados por ubiquitina. Estos hallazgos inspiraron la hipótesis de que el ancestro de los eucariotas sería una forma inusualmente compleja con una elaborada organización intracelular. Los últimos descubrimientos, obtenidos a partir de secuenciación metagenómica, reivindican esta hipótesis al demostrar que los eucariotas están relacionados con el grupo Lokiarchaeota (grupo de arqueas recientemente identificado). El descubrimiento de que las arqueas complejas serían los parientes vivos más cercanos de los eucariotas es compatible con el escenario simbiogénico para la eucariogénesis.

Una célula eucariota es, por cuenta propia, un sistema macromolecular sorprendentemente complejo, pero lo es aún más cuando se lo compara con arqueas y bacterias. Para comenzar, una célula eucariota típica tiene un volumen tres a cuatro órdenes de magnitud mayor [3, 4, 5]. Esta discrepancia de tamaño se refleja en diferencias en los principios físicos del funcionamiento celular: en la mayoría de bacterias y arqueas las proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas difunden más o menos libremente, mientras que en las eucariotas el espacio intracelular está completamente compartimentalizado de manera que las moléculas se distribuyen mediante mecanismos de transporte [6, 7]. La compartimentación y transporte interno de sustancias son posibles gracias a un elaborado sistema de endomembranas (que incluye la membrana del núcleo) y el citoesqueleto constituido por filamentos de actina y microtúbulos de tubulina (además de otras proteínas adicionales). Por otro lado, la gran mayoría de eucariotas poseen mitocondrias,

Traducción y adaptación  
Pablo Adrián Otero

Este artículo es una traducción y adaptación del artículo:  
Archaeal ancestors of eukaryotes: not so elusive any more.  
Author: Eugene V. Koonin Smith. Publicado en BMC Biology (2015) 13:84.

Pablo A. Otero es biólogo (FCEN:UBA) y docente de biología.

organelas productoras de energía, derivadas por endosimbiosis a partir de  $\alpha$ -proteobacterias [8, 9]. Aunque algunos eucariotas unicelulares carecen de mitocondrias esto se debe a una pérdida evolutiva posterior [10, 11].

Los eucariotas poseen un nivel de organización celular cualitativamente diferente de arqueas y bacterias y actualmente no se conocen organismos con características evolutivas intermedias. El análisis comparativo de células eucariotas y de diversos genomas indican que los sistemas funcionales avanzados propios de este tipo de células ya estaban presentes en el último ancestro común eucariótico (LECA). Estas características ancestrales incluyen el citoesqueleto (constituido por proteínas actina y tubulina), el poro nuclear, el espliceosoma y la red de señalización de ubiquitina, por mencionar solo algunos [12, 13, 14, 15, 16]. El origen de estos sistemas avanzados de organización celular presenta un desafío de tal magnitud que el famoso escenario de Darwin para explicar la evolución del ojo parece una solución directa a un problema fácil. Para algunos, el enigma de la eucariogénesis es tan desconcertante que hasta el infame concepto de complejidad irreductible fue alguna vez propuesto como explicación [17], aunque el rechazo no se hizo esperar [18].

A continuación, analizo los avances recientes en genómica evolutiva que plantean que el origen de los eucariotas sería mucho menos misterioso de lo que parecía hasta hace poco.

### La posición filogenética de los eucariotas: ¿grupo hermano de las arqueas?

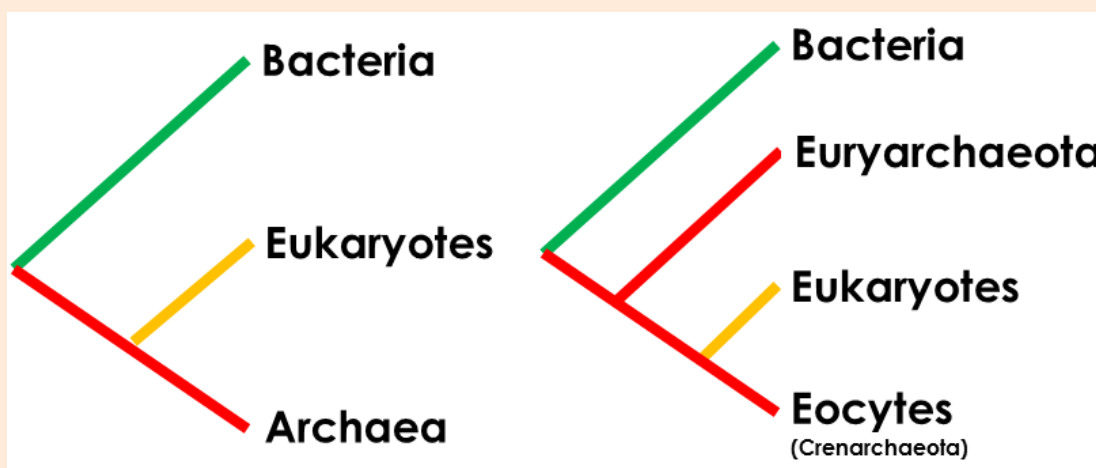
La filogenética molecular y la filogenómica ofrecen perspectivas complementarias sobre el origen de los eucariotas. El clásico árbol de la vida, basado en las secuencias del ARNr 16S y genes universales (tales como genes de proteínas involucradas en la traducción y transcripción), identifica como arqueano el origen de los sistemas de procesamiento de la información en eucariotas. Las primeras versiones de este árbol, aparecidas en los libros de texto, mostraban a los eucariotas como grupo hermano de las arqueas y excluía las bacterias [19, 20, 21, 22]. Sin embargo,

un método filogenético alternativo que utiliza el mismo ARNr 16S sugiere una forma diferente, llamada árbol eocito [23, 24] (Fig. 1).

En esta variante, los eucariotas forman un clado que está incluido dentro del taxón Archaea, como un grupo hermano de los 'eocitos' (filo de arqueas que actualmente se conoce como Crenarchaeota) [23, 24, 25, 26]. Estudios filogenéticos posteriores llegaron a conclusiones diferentes sobre las relaciones filogenéticas. Dependiendo del conjunto de datos y la metodología utilizada, se puede avalar, tanto la posición filogenética clásica de los eucariotas, como también la posibilidad de que sea un grupo hermano de las arqueas u otras posiciones dentro del Phylum Euryarchaeota (incluye principalmente metanógenos y halófilos) [27]. Además, el análisis filogenético de genes eucariotas de procedencia arqueana demostró que tienen origen en diferentes grupos de arqueas. Estos hallazgos son compatibles con la existencia de transferencia horizontal de genes entre los principales grupos de arqueas [28].

La incertidumbre de la posición filogenética de los eucariotas respecto a las arqueas es producto de resultados conflictivos obtenidos con diferentes métodos y conjuntos de datos, lo que llevó a declarar a este tema como un problema sin solución [29]. Irónicamente, poco después de que se planteara este callejón sin salida, sobrevino el descubrimiento de nuevos filos de arqueas: Korarchaeota [30], Thaumarchaeota y Aigarchaeota [31]. Los últimos estudios metagenómicos y de genómica de células individuales han llevado a una verdadera bonanza de nuevos filos arqueanos [32, 33, 34, 35] (figura 2). Filogenias independientes construidas a partir genes conservados apoyan el origen monofilético de un superfilo arqueano bautizado "TACK" (por las iniciales de los nombres de los filos incluidos: Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota y Korarchaeota [36, 37, 38, 39, 40]), y también la denominación provisoria del nuevo reino Proteoarchaeota [41, 42]. Posteriormente se ha sugerido que Proteoarchaeota incluye, además, a Bathyarchaeota y Geoarchaeota, dos nuevos filos [34].

Figura 1: Árboles filogenéticos esquemáticos que reflejan la ascendencia de los eucariotas de a partir de arqueas y eocitos. a) El árbol de tres dominios. b) El árbol eocito de dos dominios.



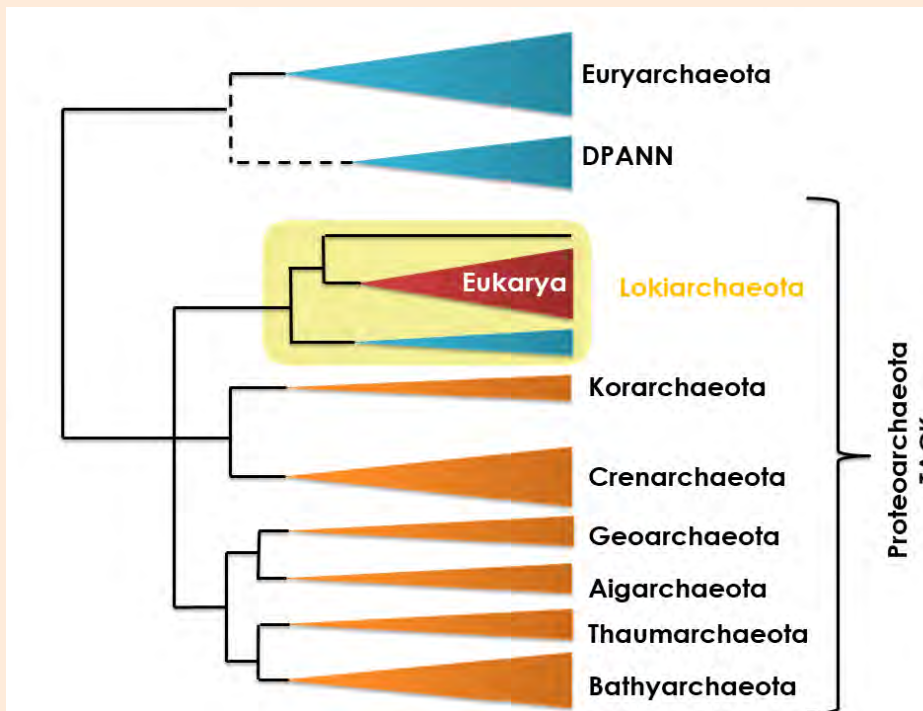


Figura 2: Árbol evolutivo de las arqueas: Proteoarchaeota, Lokiarchaeota y el probable origen de eucariotas. DPANN es un superfilo arqueano que incluye a Nanoarchaeota y otras arqueas con genomas pequeños [33]. La topología de árbol es la propuesta por Castelle [34] excepto que la rama de DPANN fue tentativamente movida (como lo indica la línea de puntos) desde una posición basal al tallo de Euryarchaeota, sobre la base de otros análisis filogenéticos que sugieren esto [41, 42, 74]. La posición de Lokiarchaeota es la propuesta por Spang [1]. Además de los eucariotas, la rama Lokiarchaeota incluye tres linajes distintos, uno de los cuales es el grupo hermano de los eucariotas. El tamaño de los triángulos refleja aproximadamente la diversidad de los grupos respectivos.

El descubrimiento de los nuevos filos de arqueas y del reino putativo Proteoarchaeota, estimuló el esfuerzo filogenómico en dilucidar la ascendencia arqueana de los eucariotas. Dos análisis filogenéticos independientes y exhaustivos realizados a partir de ARNr y genes codificadores de proteínas universales, apoyan la relación entre eucariotas y Proteoarchaeota, pero no específicamente con algún linaje del mismo [37, 44, 45]. Otra investigación [46] incluyó a los eucariotas dentro de la Proteoarchaeota pero como un grupo hermano de Thaumarchaeota. Estos resultados sugieren una solución al problema del origen de los eucariotas ya que estos habrían evolucionado a partir de las arqueas, de acuerdo con la "hipótesis extendida de eocitos" [47]. Sin embargo, las conclusiones de estos análisis filogenómicos dependen en gran medida de los conjuntos de datos y métodos empleados, y posiblemente no resuelvan de manera concluyente la relación evolutiva entre arqueas y eucariotas.

### La naturaleza quimérica de los genomas eucariotas y diferentes escenarios para la eucariogénesis

Independientemente del método empleado, el análisis filogenómico de genes eucariotas con sus homólogos en bacterias y/o arqueas revela una división fundamental en los genes de acuerdo a su procedencia (arqueana o bacteriana). Los genes de origen arqueano incluyen principalmente a los implicados en la transmisión de la información genética (genes informativos), mientras que los genes de origen bacteriano corresponden a enzimas metabólicas, transportadores y sistemas de transducción de señales (genes operacionales). Los genes bacterianos duplican en número a los genes arqueanos, lo que indica una contribución

importante de las bacterias a la composición genética eucariote [28, 48]. Dado que parece raro que los eucariotas hayan adquirido recientemente genes bacterianos, lo más probable es que la mayor parte de que la contribución provenga de la transferencia masiva de genes (proto) mitocondriales al genoma nuclear, aunque relativamente pocos genes se pueden rastrear específicamente hasta las alfa-proteobacterias. Sin embargo, la complejidad del pangenoma -proteobacterial hace imposible inferir con precisión el complemento genético del endosimbionte proto-mitocondrial, y podría dar cuenta de la aparente heterogeneidad de la herencia bacteriana [49, 50]. Un análisis reciente de la edad relativa de los genes bacterianos en eucariotas (a partir de un conjunto completo de genomas y métodos comparativos genómicos) sugiere que, aparte de los genes del cloroplasto en plantas y algas, la abrumadora mayoría de genes se adquirieron en un solo momento, que se cree habría sido la incorporación del endosimbionte primario [51].

Si en los eucariotas predominan los genes de origen bacteriano: ¿por qué generalmente (incluso en los libros de texto de biología actuales) se muestra a este grupo como hermano de arqueas y no como hermano de las -proteobacterias? Creo que no hay ninguna justificación para este último punto de vista, y la única caracterización consistente con los datos actuales del estado evolutivo de los eucariotas es como quimeras arqueobacterianas. Dicho esto, no todos los genes son iguales, y el patrimonio arqueano de los eucariotas incluye a la mayoría de los genes (y altamente conservados en secuencia) que son universales para los organismos eucarióticos o para todas las formas de vida celular [51, 52]. Este conjunto de genes, predominantemente los relacionados

con el procesamiento de la información genética, muestra la tendencia vertical en la evolución de la vida mucho mejor que cualquier otro tipo y, en consecuencia, es el más adecuado para la construcción del árbol de la vida [53]. Sin embargo, la historia de la vida no se reduce solo a la filogenia de este tipo de genes informativos [54, 55].

Suponiendo que la adquisición del endosimbionte fue previa a LECA, los escenarios de eucariogénesis se dividen en dos grupos según la naturaleza del huésped [10]. En el primer caso se concibe al huésped como una célula eucariota primitiva, amitocondrial y fagotrófica [56, 57], a menudo conocida como arqueozo. Lo atractivo de esta hipótesis es la forma de vida fagotrófica (como las amebas existentes) del arqueozo que habría engullido una bacteria, que eventualmente se convertirá en el endosimbionte [58, 59]. Sin embargo hay dos problemas con este escenario. En primer lugar, no se conocen eucariotas que nunca hayan tenido mitocondrias. Y, en segundo lugar, aunque más controvertido, se propusieron argumentos que demuestran que una célula del tamaño y complejidad eucariótica no sería viable sin múltiples organelas productoras de energía (es decir mitocondrias).

El segundo escenario plantea que la célula que capturó al endosimbionte era una arquea típica y luego esto derivó en la eucariogénesis, incluida la aparición del sistema de endomembranas y otras características eucarióticas [10, 38, 60]. Lo bueno de esta explicación es que no supone la existencia de ningún tipo de célula ancestral desconocida. El punto débil radica en la aparente extrema rareza de la endosimbiosis entre bacterias y arqueas. ¿Podría haber un tercer escenario que combine las ventajas de los anteriores y evite sus desventajas? Es lo que propongo a continuación.

### El genoma eucariota y su origen disperso en arqueas y la posible existencia de un ancestro arqueano complejo

El reciente análisis de diversos genomas de arqueas dio como resultado una serie de observaciones llamativas. Resulta que la relación evolutiva entre arqueas y eucariotas no se limita solo a los genes implicados en los sistemas de procesamiento de la información genética, sino que también implica otros que son esenciales para la organización intracelular eucariota [61]. Lo llamativo es que los homólogos de estos genes eucarióticos se encuentran dispersos en distintos tipos de arqueas. Quizás el caso más notable sea el sistema de señalización con ubiquitina, el cual se ha encontrado únicamente en el genoma de *Caldiarchaeum subterrenium* (del nuevo filo candidato *Aigarchaeota*) [31]. Proteínas similares a la ubiquitina y su maquinaria de conjugación fueron encontradas previamente en otras arqueas, pero estas eran homólogas distantes de las respectivas proteínas eucarióticas, por lo que

la relación ancestral seguía sin estar clara [62, 63]. El caso de *C. subterrenium* es diferente, ya que en este genoma, los genes para un homólogo de la ubiquitina, la ubiquitina ligasa y una desubiquitinasa forman un operón, y lo más importante, estas proteínas se asemejarían claramente con sus homólogas eucariotas. Por lo tanto, ya no quedan dudas de que se ha logrado rastrear la ascendencia arqueana de los sistemas mediados por ubiquitina. Lo mismo ocurre con el descubrimiento de las actinas arqueanas (denominadas crenactinas) que están presentes en varios grupos de *Proteoarchaeota* [64] y forman filamentos semejantes al citoesqueleto eucariótico [65]. Otros ejemplos de ancestros arqueanos de sistemas eucarióticos clave implicados en la formación de estructuras intracelulares son las tubulinas [66] y el complejo ECSRT-III que participa en la división celular y la remodelación de la membrana intracelular [67, 68]. Notablemente, estos genes se encontraron principalmente en diferentes grupos de *Proteoarchaeota*, de acuerdo con los últimos resultados filogenómicos discutidos anteriormente.

El descubrimiento de este genoma eucarionte con origen disperso arqueano ha motivado la hipótesis de que el huésped para el endosimbionte protomitocondrial habría sido una arquea compleja. Dada la amplia transferencia horizontal de genes en este tipo de células, combinado con el hecho que la mayoría de los linajes arqueanos aparentemente evolucionaron bajo un régimen de racionalización [40, 69], se especula que esta forma arqueana ancestral combinó, dentro de un solo genoma, varios componentes del genoma eucarionte que ahora se encuentran dispersos en diferentes arqueas existentes. Este hipotético organismo, aunque claramente era una arquea, habría sido capaz de una forma primitiva de fagocitosis que habría facilitado la captura del endosimbionte [38, 61, 64]. Es razonable suponer que esta arquea ancestral pudo haber adquirido genes por transferencia horizontal, lo que sugiere una explicación alternativa a las diferentes afinidades de genes "bacterianos" en eucariotas.

Un reciente e inesperado descubrimiento indica que las arqueas que se asemejan a este supuesto antepasado no están extintas.

### Loki: ¿el ancestro arqueano de eucariotas encontrado vivo y sano?

Loki entra en escena. El análisis metagenómico de los sedimentos del fondo del mar cerca de un sitio de ventilación hidrotermal en el Ártico, llamado Castillo de Loki, reveló un supuesto linaje arqueano dentro de *Proteoarchaeota* [1, 2]. Dado el interés en saber si las arqueas podrían arrojar luz sobre el origen de los eucariotas, Thijs Ettema y sus colegas llevaron a cabo la secuenciación completa de las muestras metagenómicas obtenidas en este sitio y lograron ensamblar un genoma casi completo, así como

varios genomas parciales, de un nuevo grupo llamado Lokiarchaeota (simplemente Loki, para abreviar). Los resultados de estos análisis superan las expectativas más audaces. De hecho, Loki combina las dos características clave predichas para el ancestro arqueano de los eucariotas. Primero, en un árbol filogenético construido a partir de 36 genes altamente conservados que codifican componentes de los sistemas de procesamiento de la información genética, los eucariotas quedan incluidos dentro de la rama Loki (figura 2). Este hallazgo resuelve el problema de la relación evolutiva entre eucariotas y arqueas: ya no hay ninguna duda de que los sistemas de procesamiento de información de eucariotas evolucionaron a partir de una rama específica en las profundidades del árbol arqueano, y ahora esa rama es conocida.

En segundo lugar, e igualmente importante, el genoma de Loki revela la variedad de las características eucarióticas predichas para el ancestro arqueano de eucariotas [38, 61, 64]. Específicamente, el genoma de Loki codifica para crenactinas, proteínas homólogas de las gelsolinas eucarióticas (otra familia de proteínas esenciales del citoesqueleto), el complejo ESCRT-III, una familia de pequeñas GTPasas tipo Ras y el sistema completo de ubiquitina. Este repertorio de genes predice, de manera confiable, la existencia de un citoesqueleto complejo y de remodelación de membrana, además de ser compatible con una capacidad fagocítica rudimentaria. Por otra parte, el análisis filogenético indica que la mayoría de estos homólogos de genes eucarióticos ocupan una posición basal en los árboles respectivos, lo que agrega credibilidad a la relación ancestral [1].

Por lo tanto, Loki es, por mucho, el mejor candidato actual para descendiente directo del antepasado arqueano de eucariotas. Es crucial enfatizar que, a pesar de su complejidad organizativa genómica, Loki es una arquea típica y no el hipotético arqueozoo hipotético. A pesar de la presencia de elementos del citoesqueleto, faltan las características clave y fácilmente detectables en cualquier genoma eucariótico, como los componentes del poro nuclear y el espliceosoma, así como los intrones. Además toda la maquinaria de replicación, así como el conjunto de todas las enzimas de la biogénesis de la membrana tienen características arqueanas [1]. Por lo tanto, aunque el descubrimiento de Loki no elimina definitivamente el escenario de eucariogénesis a partir de un arqueozoo, aumenta sustancialmente la credibilidad del escenario simbiogenético.

### Implicancias y preguntas que quedan abiertas

El problema extremadamente difícil de la eucariogénesis actualmente parece ser más abordable gracias a los avances de la genómica comparada de las arqueas y, en particular, al

espectacular progreso de la metagenómica. El camino que llevó a esta nueva comprensión fue logrado por la secuenciación de muchos genomas arqueanos, seguidos por detallados análisis filogenómicos. Estos produjeron evidencia creciente de la relación evolutiva entre Proteoarchaeota y Eukaryota, y permitieron la reconstrucción parcial del genoma de un ancestro arqueano complejo. El descubrimiento de Loki precipitó este avance. El origen de eucariotas a partir de un grupo específico de arqueas, con origen en las profundidades del árbol evolutivo arqueano (específicamente dentro de Proteoarchaeota), debe considerarse un hecho establecido. También sabemos que los parientes arqueanos más cercanos de los eucariotas, poseen una variedad de genes que son los posibles antepasados de genes eucarióticos típicos que involucrados en el citoesqueleto y a otros aspectos de la organización celular eucariótica. Todas estas observaciones hacen que el escenario simbiogenético de la eucariogénesis sea más creíble de lo que lo fue en el pasado.

La claridad, recientemente alcanzada, en la comprensión de estos aspectos clave de la eucariogénesis promueve una reevaluación de algunos de los conceptos más generales en biología. El primero es la representación de toda la historia de la vida como un único árbol evolutivo, una gran idea que se remonta a la famosa ilustración de Darwin en su libro *El Origen de las especies* [70]. El escenario simbiogenético de la eucariogénesis desafía rotundamente este concepto, ya que un importante reino de la vida, los eucariotas, habría surgido de una manera no arbórea, sino mediante la fusión de ramas diferentes y distantes de dicho árbol. Es innegable la importancia de los árboles filogenéticos para comprender la evolución de genes individuales, conjuntos de genes y taxones mayores, especialmente aquellos que incluyen a los eucariotas multicelulares [71]. Sin embargo, estos nuevos hallazgos indican que las principales transiciones en la evolución a menudo, y tal vez típicamente, se producen a través de la fusión de células y/o genomas de organismos distantemente relacionados. El segundo concepto es el número y la naturaleza de los dominios primarios de la vida. A finales de la década de 1980, basándose en los árboles de ARNr, Woese y sus colegas desarrollaron el esquema de tres dominios (Fig. 1a) [19]. La inclusión de eucariotas dentro del clado Archaea, asegurada por el descubrimiento de Loki, refuta este esquema y muestra que, a partir de la filogenia construida a partir de los genes universales (principalmente informativos), la única interpretación consistente con los datos es la existencia de dos dominios primarios: bacterias y arqueas (con eucariotas incluidos en este último)(Fig. 1b) [45].

Loki lleva el nombre del dios embaucador de la mitología nórdica, lo que supone una veta maliciosa, pero también es el representante del

cambio [73]. Seguramente, la transición que Loki parece haber provocado, el origen de los eucariotas, fue una de las más trascendentales en la historia de nuestro planeta.

¿Qué sigue a continuación? ¿Loki es el puente definitivo entre arqueas y eucariotas? Personalmente creo que se trata de un puente a medio construir. Queda mucho trabajo por hacer. En primer lugar, Loki ciertamente no es el ancestro arqueano de los eucariotas, ya que esa forma de vida existió hace más de mil millones de años. Es muy posible que se descubran parientes más cercanos de antepasados eucarióticos, quizás con una complejidad organizativa aún mayor. Loki es solo el comienzo en esta búsqueda de antepasados pero de ninguna manera el final. Sin

embargo, la caracterización posiblemente exhaustiva de la diversidad de arqueas (y bacterias) mediante métodos de metagenómica y genómica de células individuales sería la parte fácil de este asunto, el desafío radica en la investigación de la biología de estos organismos. Aunque nunca podemos saber que ocurrió precisamente hace más de mil millones de años, para mí, la demostración de la endosimbiosis arqueobacteriana en el laboratorio significaría el paso final. Esto es extremadamente difícil pero, ¿quién hubiera predicho hace 25 años que se convertiría en un ejercicio casi rutinario secuenciar completamente genomas de organismos que no se pueden siquiera cultivar?

## Referencias Bibliográficas

Nota: la bibliografía de la sección «Traducciones» es citada y reproducida tal cual figura en el artículo original.

1. Spang A, Saw JH, Jorgensen SL, Zaremba-Niedzwiedzka K, Martijn J, Lind AE, et al. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*. 2015;521:173–9.
2. Embley TM, Williams TA. Evolution: steps on the road to eukaryotes. *Nature*. 2015;521:169–70.
3. Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature*. 2010;467:929–34.
4. Lane N. Energetics and genetics across the prokaryote-eukaryote divide. *Biol Direct*. 2011;6:35.
5. Lane N. The vital question: energy, evolution, and the origins of complex life. London: W.W.Norton & Company; 2015.
6. Hudder A, Nathanson L, Deutscher MP. Organization of mammalian cytoplasm. *Mol Cell Biol*. 2003;23:9318–26.
7. Guigas G, Kalla C, Weiss M. The degree of macromolecular crowding in the cytoplasm and nucleoplasm of mammalian cells is conserved. *FEBS Lett*. 2007;581:5094–8.
8. Gray MW. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:a011403.
9. Zimorski V, Ku C, Martin WF, Gould SB. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Curr Opin Microbiol*. 2014;22:38–48.
10. Embley TM, Martin W. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*. 2006;440:623–30.
11. van der Giezen M. Hydrogenosomes and mitosomes: conservation and evolution of functions. *J Eukaryot Microbiol*. 2009;56:221–31.
12. Mans BJ, Anantharaman V, Aravind L, Koonin EV. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle*. 2004;3:1612–37.
13. Collins L, Penny D. Complex spliceosomal organization ancestral to extant eukaryotes. *Mol Biol Evol*. 2005;22:1053–66.
14. Baptiste E, Charlebois RL, MacLeod D, Brochier C. The two tempos of nuclear pore complex evolution: highly adapting proteins in an ancient frozen structure. *Genome Biol*. 2005;6:R85.
15. Makarova KS, Wolf YI, Mekhedov SL, Mirkin BG, Koonin EV. Ancestral paralogs and pseudoparalogs and their role in the emergence of the eukaryotic cell. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:4626–38.

16. Schlacht A, Herman EK, Klute MJ, Field MC, Dacks JB. Missing pieces of an ancient puzzle: evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6:a016048.
17. Kurland CG, Collins LJ, Penny D. Genomics and the irreducible nature of eukaryote cells. *Science*. 2006;312:1011–4.
18. Martin W, Dagan T, Koonin EV, Dipippo JL, Gogarten JP, Lake JA. The evolution of eukaryotes. *Science*. 2007;316:542–3. author reply 542–3.
19. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:4576–9.
20. Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 1997;276:734–40.
21. Pace NR. Time for a change. *Nature*. 2006;441:289.
22. Pace NR. Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009;73:565–76.
23. Lake JA. Origin of the eukaryotic nucleus determined by rate-invariant analysis of rRNA sequences. *Nature*. 1988;331:184–6.
24. Lake JA, Henderson E, Oakes M, Clark MW. Eocytes: a new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:3786–90.
25. Lake JA. Optimally recovering rate variation information from genomes and sequences: pattern filtering. *Mol Biol Evol*. 1998;15:1224–31.
26. Rivera MC, Lake JA. Evidence that eukaryotes and eocyte prokaryotes are immediate relatives. *Science*. 1992;257:74–6.
27. Pisani D, Cotton JA, McInerney JO. Supertrees disentangle the chimerical origin of eukaryotic genomes. *Mol Biol Evol*. 2007;24:1752–60.
28. Yutin N, Makarova KS, Mekhedov SL, Wolf YI, Koonin EV. The deep archaeal roots of eukaryotes. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1619–30.
29. Gribaldo S, Poole AM, Daubin V, Forterre P, Brochier-Armanet C. The origin of eukaryotes and their relationship with the Archaea: are we at a phylogenomic impasse? *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:743–52.
30. Elkins JG, Podar M, Graham DE, Makarova KS, Wolf Y, Randau L, et al. A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:8102–7.

31. Nunoura T, Takaki Y, Kakuta J, Nishi S, Sugahara J, Kazama H, et al. Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:3204–23.
32. Lloyd KG, Schreiber L, Petersen DG, Kjeldsen KU, Lever MA, Steen AD, et al. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature.* 2013;496:215–8.
33. Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature.* 2013;499:431–7.
34. Castelle CJ, Wrighton KC, Thomas BC, Hug LA, Brown CT, Wilkins MJ, et al. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Curr Biol.* 2015;25:690–701.
35. Eme L, Doolittle WF. Microbial diversity: a bonanza of phyla. *Curr Biol.* 2015;25:R227–30.
36. Guy L, Ettema TJ. The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol.* 2011;19:580–7.
37. Williams TA, Foster PG, Nye TM, Cox CJ, Embley TM. A congruent phylogenomic signal places eukaryotes within the Archaea. *Proc Biol Sci.* 2012;279:4870–9.
38. Martijn J, Ettema TJ. From archaeon to eukaryote: the evolutionary dark ages of the eukaryotic cell. *Biochem Soc Trans.* 2013;41:451–7.
39. Yutin N, Puigbo P, Koonin EV, Wolf YI. Phylogenomics of prokaryotic ribosomal proteins. *PLoS One.* 2012;7:e36972.
40. Wolf YI, Makarova KS, Yutin N, Koonin EV. Updated clusters of orthologous genes for Archaea: a complex ancestor of the Archaea and the byways of horizontal gene transfer. *Biol Direct.* 2012;7:46.
41. Petitjean C, Deschamps P, Lopez-Garcia P, Moreira D. Rooting the domain archaea by phylogenomic analysis supports the foundation of the new kingdom Proteoarchaeota. *Genome Biol Evol.* 2015;7:191–204.
42. Petitjean C, Deschamps P, Lopez-Garcia P, Moreira D, Brochier-Armanet C. Extending the conserved phylogenetic core of archaea disentangles the evolution of the third domain of life. *Mol Biol Evol.* 2015;32:1242–54.
43. Guy L, Spang A, Saw JH, Ettema TJ. 'Geoarchaeote NAG1' is a deeply rooting lineage of the archaeal order Thermoproteales rather than a new phylum. *ISME J.* 2014;8:1353–7.
44. Lasek-Nesselquist E, Gogarten JP. The effects of model choice and mitigating bias on the ribosomal tree of life. *Mol Phylogenet Evol.* 2013;69:17–38.
45. Williams TA, Foster PG, Cox CJ, Embley TM. An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature.* 2013;504:231–6.
46. Kelly S, Wickstead B, Gull K. Archaeal phylogenomics provides evidence in support of a methanogenic origin of the Archaea and a thaumarchaeal origin for the eukaryotes. *Proc Biol Sci.* 2011;278:1009–18.
47. Williams TA, Embley TM. Archaeal "dark matter" and the origin of eukaryotes. *Genome Biol Evol.* 2014;6:474–81.
48. Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Rotte C, Sebastiani F, Gelius-Dietrich G, et al. A genome phylogeny for mitochondria among alpha-proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Mol Biol Evol.* 2004;21:1643–60.
49. Esser C, Martin W, Dagan T. The origin of mitochondria in light of a fluid prokaryotic chromosome model. *Biol Lett.* 2007;3:180–4.
50. Ku C, Nelson-Sathi S, Roettger M, Garg S, Hazkani-Covo E, Martin WF. Endosymbiotic gene transfer from prokaryotic pangenomes: Inherited chimerism in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:10139–46.
51. Ku C, Nelson-Sathi S, Roettger M, Sousa FL, Lockhart PJ, Bryant D, et al. Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes. *Nature.* 2015;524:427–32.
52. Cotton JA, McInerney JO. Eukaryotic genes of archaeobacterial origin are more important than the more numerous eubacterial genes, irrespective of function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:17252–5.
53. Puigbo P, Wolf YI, Koonin EV. Search for a Tree of Life in the thicket of the phylogenetic forest. *J Biol.* 2009;8:59.
54. Martin WF. Early evolution without a tree of life. *Biol Direct.* 2011;6:36.
55. O'Malley MA, Koonin EV. How stands the Tree of Life a century and a half after The Origin? *Biol Direct.* 2011;6:32.
56. Roger AJ. Reconstructing early events in eukaryotic evolution. *Am Nat.* 1999;154:S146–63.
57. Cavalier-Smith T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:297–354.
58. Poole A, Penny D. Eukaryote evolution: engulfed by speculation. *Nature.* 2007;447:913.
59. Poole AM, Penny D. Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *Bioessays.* 2007;29:74–84.
60. Martin W, Koonin EV. Introns and the origin of nucleus-cytosol compartmentation. *Nature.* 2006;440:41–5.
61. Koonin EV, Yutin N. The dispersed archaeal eukaryome and the complex archaeal ancestor of eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6:a016188.
62. Makarova KS, Koonin EV. Archaeal ubiquitin-like proteins: functional versatility and putative ancestral involvement in tRNA modification revealed by comparative genomic analysis. *Archaea.* 2010;2010:710303.
63. Maupin-Furlow JA. Prokaryotic ubiquitin-like protein modification. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:55–175.
64. Yutin N, Wolf MY, Wolf YI, Koonin EV. The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biol Direct.* 2009;4:9.
65. Ettema TJ, Lindas AC, Bernander R. An actin-based cytoskeleton in archaea. *Mol Microbiol.* 2011;80:1052–61.
66. Yutin N, Koonin EV. Archaeal origin of tubulin. *Biol Direct.* 2012;7:10.
67. Samson RY, Bell SD. Ancient ESCRTs and the evolution of binary fission. *Trends Microbiol.* 2009;17:507–13.
68. Makarova KS, Yutin N, Bell SD, Koonin EV. Evolution of diverse cell division and vesicle formation systems in Archaea. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:731–41.
69. Csuros M, Miklos I. Streamlining and large ancestral genomes in Archaea inferred with a phylogenetic birth-and-death model. *Mol Biol Evol.* 2009;26:2087–95.
70. Darwin C. On the origin of species. 1st ed. London: Murray; 1859.
71. Koonin EV, Wolf YI. The fundamental units, processes and patterns of evolution, and the Tree of Life conundrum. *Biol Direct.* 2009;4:33.
72. Nelson-Sathi S, Sousa FL, Roettger M, Lozada-Chavez N, Thiergart T, Janssen A, et al. Origins of major archaeal clades correspond to gene acquisitions from bacteria. *Nature.* 2015;517:77–80.
73. Vasich M. Loki. Amazon Digital Services, Inc.; 2011.