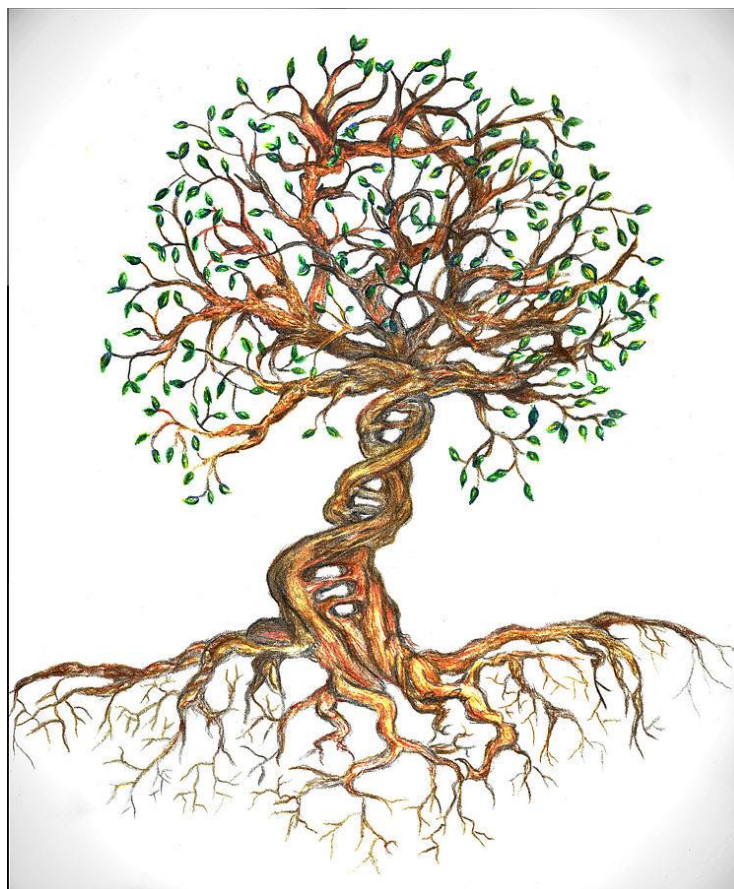


# **De discussie die Asgard Archaea voortbrengt over de fylogenetische boom**

Hoe Asgard archaea de indeling van de fylogenetische boom compleet kan veranderen.

Literatuuronderzoek naar hoe de Asgard archaea de drie domeinen van het leven compleet veranderd



Ronja Hulst  
S3133656  
Biologie Pre-master  
Januari 2019  
Prof. A.J.M. Driessen

# **De discussie die Asgard Archaea voortbrengt over de fylogenetische boom**

Hoe Asgard archaea de indeling van de fylogenetische boom compleet kan veranderen

De discussie die Asgard Archaea voortbrengt over de fylogenetische boom  
Hoe Asgard archaea de indeling van de fylogenetische boom compleet kan  
veranderen

Ronja Hulst  
S3133656  
Biology  
Faculty for science and engineering  
Pre-master MBB - Bachelor scriptie  
Prof. A.J.M. Driessen

## Abstract

Er wordt veel gespeculeerd over hoe het leven is ontstaan en wat de eerste organismen waren. Er bestaat meerdere hypothesen over hoe de fylogenetische boom in de oorsprong er uit ziet. Er wordt gespeculeerd dat dat alle organismen zijn geëvolueerd uit een voorouderlijke gemeenschap van primitieve cellen. Deze organismen worden ook wel de last universal common ancestor genoemd (LUCA). De fylogenetische boom van het leven is een concept dat steeds veranderd. Nadat Woese de Archaea had beschreven als een fundamenteel ander organisme dan de bacterie, is deze groep geaccepteerd als een nieuw domein in de fylogenetische boom.

Nu zijn er drie domeinen; de Bacteriën, eukaryoten en archaea. Over de archaea is nog niet heel veel bekend, omdat veel van de soorten nog nooit zijn gekweekt en onderzocht. Wel wordt er gen onderzoek uitgevoerd met behulp van sequensing. Door de nieuwe technieken zijn er veel ontdekkingen gedaan over de fylogenetische boom en waar alle organismen thuishoren. Recentelijk is er een nieuwe soort Archaea ontdekt, de Asgard archaea. Deze soort archaea heeft een heleboel genetische overeenkomsten met Eukaryoten, meer dan bacteriën. Er zijn veel onderzoeken naar archaea, maar veel kennis ontbreekt nog.

Verschillende theorieën over de boom zijn de canonical theorie die we nu gebruiken met de drie domeinen. Een andere is de eocyte hypothese, waarin eukaryoten een aftakking zijn in de archaea, die stelt dat er toch twee domeinen zijn. De Fusion hypothese, die stelt dat eukaryoten een resultaat zijn van de fusie van een Archeon en een bacteriecel. Ook heb je de hypothese dat archaea de eerste organismen in de evolutie waren.

Voor elke hypothese is er wetenschappelijk bewijs die kan bevestigen dat deze zouden kunnen kloppen. Hoewel alle theorieën logisch overkomen, is er nog te weinig bekend om er concrete conclusies over te trekken. Het kweken van de Asgard archaea en verder onderzoek zou meer helderheid geven over het ontstaan van het leven zoals dat nu bekend is.

## **Voorwoord**

Deze scriptie is geschreven in als laatste onderdeel van mijn pre-master. Het is officieel een bachelor scriptie en als ik deze heb voltooid mag ik beginnen met de master Biologie.

Het behandelt de nieuw ontdekte Asgard Archaea, Asgard archaea is een archaea die de afgelopen is ontdekt en het is dus een vrij nieuw onderwerp. In deze scriptie wordt uitgezet wat voor invloeden deze ontdekking heeft op de fylogenetische boom van het leven.

Graag wil ik Prof. Dr. Driessen bedanken voor het begeleiden en beoordelen van de scriptie.

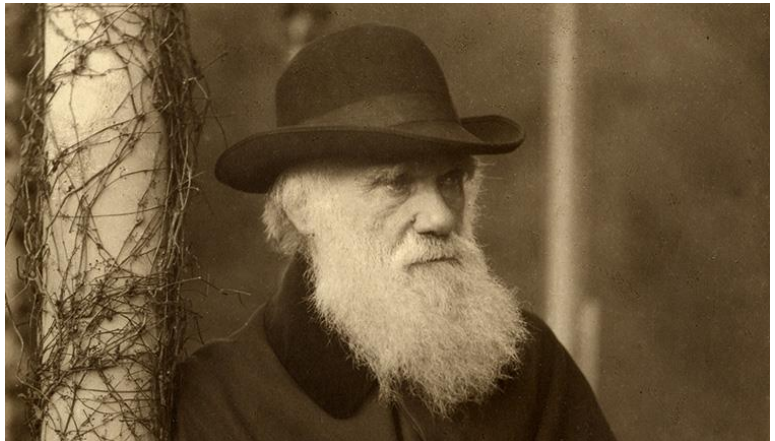
# Inhoudsopgave

Abstract	3
Voorwoord	4
Inleiding	6
1. Archaea	8
Geschiedenis	8
kenmerken	8
Soorten archaea	9
2. Relatie archaea tot andere domeinen	11
Bacteriën	11
Eukaryoten	12
3. Asgard Archaea	14
4. De fylogenetische boom	17
Conclusie/discussie	21
Referenties	22

## Inleiding

Al het leven op aarde is opgebouwd uit dezelfde basiscomponenten. Koolstof is een van de belangrijkste componenten. De complexe moleculen die de basis vormen van het leven zijn koolstofverbindingen met andere elementen. Vaak zijn deze andere elementen zuurstof en waterstof, maar ook stikstof, fosfor en zwavelverbindingen met koolstof komen veel voor. Vier macromoleculen vormen de bouwstenen van al het leven op aarde. Deze bouwstenen zijn DNA, Suikers, Vetzuren en eiwitten.

Omdat alle organisme dezelfde DNA-structuur hebben, is het niet vreemd dat alle organismen op aarde gerelateerd zijn aan elkaar. Zeker sinds de recentelijke doorbraak van Hoshika et al.[15], die erin geslaagd zijn om synthetisch DNA te maken met 4 extra base paren, is het aannemelijk dat alle organismen vanuit een punt zijn geëvolueerd. [15] Uiteindelijk hebben alle organismen dus dezelfde voorouder(s) (last universal common ancestor (LUCA) waar alle organismen uit geëvolueerd zijn. Deze relaties zijn voor het eerst vast gelegd door Charles Darwin in de fylogenetische boom van het leven.



Afbeelding 1: Charles Robert Darwin. "de vader van de evolutietheorie" (1809-1882)

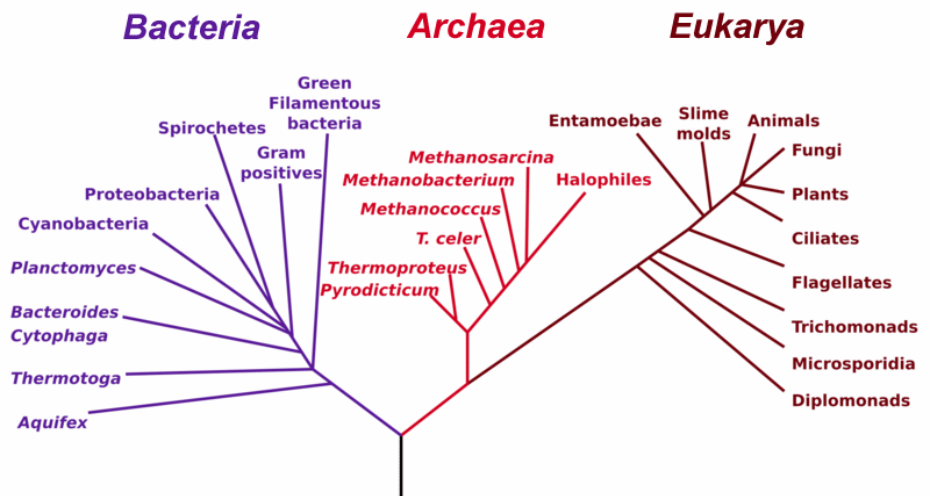
De fylogenetische boom van het leven is een belangrijk concept in het organiseren van de biologie. De boom beeldt het proces van de evolutie uit en hoe alle nu levende organisme aan elkaar gerelateerd zijn. Dit werd gedaan door middel van taxonomie of te wel de morfologische en anatomische eigenschappen van organismen. Vervolgens werd er gebruik gemaakt van cladistiek; een methode om de evolutionaire relaties van organismes te bepalen op de grond van synapomorfieën. Een Synapomorfie is een gemeenschappelijke eigenschap van een taxonomische groep die geërfd is van een laatste gemeenschappelijke voorouder van het taxon. Niet alle afstammelingen hoeven dezelfde synapomorfieën te bezitten, omdat bij sommige deze later weer zijn verdwenen.

Tegen het eind van de twintigste eeuw werd het duidelijk dat de bestaande boom niet overal correct was. Een grote innovatie in samenstelling van de boom kwam door de relatief nieuw cytologisch onderzoek en biochemisch onderzoek aan eiwitten en DNA. Door het sequensen van DNA kan microbiel en ander leven beter geclassificeerd worden. Dit leidde tot het indelen van de fylogenetische boom in drie domeinen; De bacteriën, Archaea en de eukaryoten. [2]

Door het gebruik van gen onderzoek om organismen te classificeren zijn er veel oude classificaties die nu niet meer kloppen. De eenvoudige indeling van het planten en dierenrijk was niet meer correct. Er waren veel groepen die niet meer te plaatsen waren in die rijken of juist bij beide passen. Zoals de schimmels die een eigen rijk bleken te zijn. Een ander voorbeeld hiervan is dat de vogels ook bij de reptielen horen, omdat het dezelfde voorouders deelt met krokodillen en hagedissen, wat voor gen onderzoek nog niet bekend was. Een ander voorbeeld

is dat bacteriën en archaea eerst in dezelfde groep werden gezet, terwijl uiteindelijk Woese en Fox (1977) erachter kwamen dat het hele verschillende organismen zijn.

Sinds Darwin de eerste schets maakte van de fylogenetische boom, heeft de boom veel veranderingen ondergaan. Helemaal aan het begin van de boom zijn er alleen maar prokaryoten. Deze prokaryoten zijn allemaal geëvolueerd zijn uit een gemeenschappelijke voorouder; de last universal common ancestor (LUCA)[3]. Hier splitst deze in het domein bacteria en de voorloper van de archaea en eukaryoot. Vervolgens splitst de boom zich verder in de verschillende rijken, stammen, klassen, ordes, families, geslachten en soorten.



Afbeelding 2: schematische versimpelde weergave van de fylogenetische boom van het leven zoals die nu geaccepteerd is. Het eerste splitspunt is de last universal common ancestor (LUCA) en bij archaea en eukarya splitst de boom weer. Hier is de boom in drie domeinen verdeeld.[1]

Over de jaren heen is de fylogenetische boom dus steeds veranderd, het is geen vaststaand gegeven. Elke keer als er nieuwe ontdekkingen worden gedaan kan het zijn dat de fylogenetische boom wordt verfijnt, omdat blijkt dat bepaalde organismen dichter bij elkaar horen of verder van elkaar vandaan dan in de eerste instantie werd gedacht. Ook is de boom gecontamineerd door horizontale genoverdracht.

Er zijn meerdere hypothesen over hoe het begin van de boom is eruit hoort te zien, zo heb je de canonical theorie die in afbeelding 1 weergegeven staat. Deze hypothesen worden bevestigd door fylogenetische analyse van genen. De eocyte hypothesen, waarin eukaryoten een aftakking zijn in de archaea. De Fusion hypothesen, die stelt dat eukaryoten een resultaat zijn van de fusie van een Archeon en een bacterieel cel. Ook heb je de hypothesen dat archaea de eerste organismen in de evolutie waren.

Recentelijk is er een nieuwe stam van archaea ontdekt. Deze nieuwe stam wordt de Asgard archaea genoemd. Hieronder vallen verschillende klassen archaea. De Asgard Archaea hebben veel genetische overeenkomsten met eukaryoten. Zoveel zelfs dat er gespeculeerd wordt dat het hele domein eukarya een aftakking is van de Archaea en er eventueel weer twee domeinen moeten komen. In deze scriptie wordt eruit gezet wat we al weten over de drie domeinen en wat er wordt verwacht van dit organisme en wat voor invloed de ontdekking van dit organisme heeft op de fylogenetische boom.

# 1. Archaea

## Geschiedenis

De archaea, voor het eerst beschreven in 1977 door Woese en Fox, is een van de drie domeinen van het leven naast Bacteria en eukaryoten. Woese en Fox scheidde de archaea van de andere prokaryoten als derde domein van het leven.[4]

De archaea en bacteria vielen eerst onder hetzelfde domein en werden respectievelijk Archaebacteriën en Eubacteria genoemd. De erkenning van archaea als derde levensvorm werd mede mogelijk gemaakt door een nieuwe technologie voor sequentie analyse en oligonucleotide catalogisering.

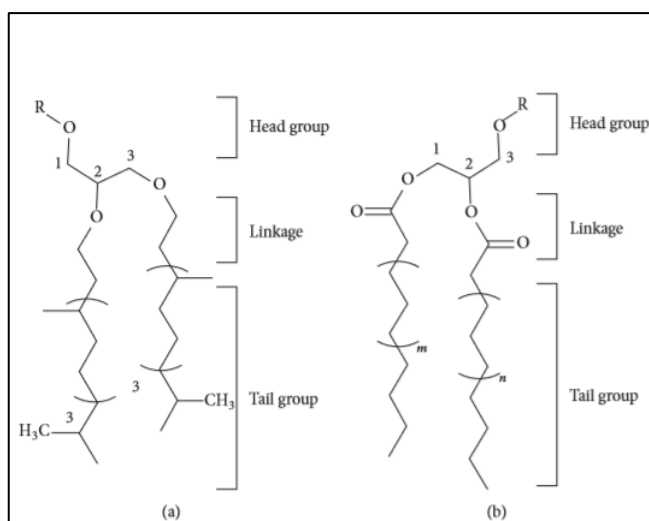
Woese gebruikte een kleine sub eenheid ribosomaal RNA (SSU rRNA) als fylogenetische marker. Dit leidde tot het onderscheid van de Archaea als een verschillende groep micro-organismen. De SSU rRNA's in deze organismen hadden bepaalde "sequence-signatures" die te onderscheiden zijn van bacteriën. Na meer onderzoek bleken ze ook verschillend te zijn van de eukaryoten. Ook andere kenmerken (ecologisch, moleculair en biochemisch) versterkte de unieke natuur van de archaea. Daarom is bepaald dat de Archaea een apart domein is.[6]

## Kenmerken

Archaea zijn prokaryoten wat betekend dat ze geen compartimentering hebben van hun cel, net zoals bacteriën. Het zijn eencellige organismen, zijn tussen en 0,1 en 15  $\mu\text{m}$  in diameter en hebben gevarieerde vormen. Behalve de celstructuur en metabolisme, lijken archaea veel op eukaryoten in de transcriptie en translatie. Archaea een enkel

celmembraan, die bestaan uit glycerol-ether lipiden (op alcohol gebaseerde vetten). Terwijl zowel bacteriën als eukaryoten Glycerol-ester lipiden hebben in hun celmembraan. Dit verschil in celmembraan kan verklaard worden door dat archaea vaak op warme temperaturen leven en dit beter kan door het verschil in celmembraan. Uit genoom analyse blijkt ook dat archaea naast vette alcoholen ook genen hebben die coderen voor eiwitten om vetzuren te synthetiseren en te kataboliseren. [8]

Archaea hebben verschillende soorten metabolisme die niet voorkomen in eukaryoten, maar wel in bacteriën zoals stikstoffixatie, denitrificatie,



*Figuur 1: structurele representatie van lipiden die gebruikt worden in archaeïsche en prokaryotische/eukaryotische membranen. (a) structuur van een isoprenoïde gebaseerde lipide die gebruikt wordt in membranen van archaea. (b) acyl keten gebaseerde lipide die gebruikt wordt in de formatie van prokaryotische/eukaryotische membranen. De grootste verschillen tussen de lipiden zijn de verbinding aan de head group glycerol, de positie op glycerol waar de verbinding zit en het type koolwaterstoffen in de keten.[8]*



chemolithrofie en hyper thermofiele groei. Archaea is het enige organisme met methanogenese (de productie van methaan als metabool bijproduct). Het metabolisme van Archaea wordt beschouwd als buitengewoon divers. Halofiele archaea lijken goed te groeien in zoutrijke omgevingen, omdat ze specifieke genen bevatten voor een metabolische route die osmose beperkt. Er is echter nog geen archaea ontdekt die fotosynthese uitvoert met behulp van chlorofyl[16]. Archaea zijn over het algemeen onschadelijk voor andere organismen en veroorzaken geen ziektes.

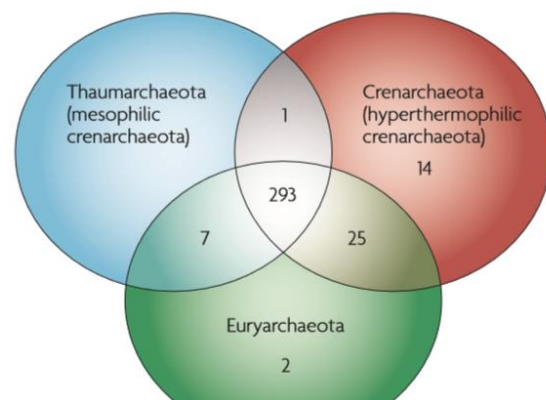
## Soorten archaea

De classificatie van de archaea is constant aan het veranderen. Met elke nieuwe data die binnenkomt, kan de fylogenetische boom van de archaea weer worden aangevuld. Het classificatiesysteem die momenteel gebruikt wordt organiseren archaea in groepen organismen die gezamenlijke voorouders delen. Deze methode maakt veel gebruik van het sequensen van ribosomaal RNA. Binnen het Domein archaea zitten momenteel drie superphylum/rijken. De DPANN-archaea, *Euryarchaeota* en *proteoarchaeota*.

Onder de DPANN archaeota vallen de *Diapherotrites*, *Aenigmarchaeota*, *Parvarchaeota*, *Nanohaloarchaeota* en de *Nanoarchaeota*. [10] Van de nanoarchaeota is momenteel één soort bekend, de *Nanoarchaeum equitans*. Deze soort is geïsoleerd van de bodem van de Atlantische oceaan. Deze archaea is in symbiose met *ignicoccus*, een andere soort archaea.

Onder het fylum *Euryarchaeota* vallen de methanogenen, Halobacteriën en extreem thermofiele aeroben en anaeroben. Op geothermische plekken zijn met meta-analyse een overvloed aan nog niet gecultiveerde thermofiele archaea gevonden. Veel van deze archaea zijn onderzocht met genomonderzoek en single cell sequensing. [17] De rol van *Euryarchaeota* in oppervlakte zeewater is nog niet bekend. Deze soort zoals vele andere archaea soorten is nog niet gecultuurd, waardoor er nog niet heel veel over bekend is. [30] De methanogenen produceert methaan, en komen voor in de darmen van dieren waar ze mede winderigheid veroorzaakt. De Halobacteriën leven in extreem zoute omgeving en grote culturen zien er roodachtig uit door de aanwezigheid van bacteriorhodopsin in het membraan.

Het laatste rijk is de Proteoarchaeota. Onder dit rijk vallen twee stammen/fyla de TACK archaeota en de Asgard Archaea. Onder de TACK vallen *thaumarcheota*, *Aigarchaeota*, *korarcheota* en *crenarcheota*. *Korarchaeota* worden gezien als een van de meest primitieve levensvormen en is alleen gevonden in een hot spring in Yellowstone nationaal park. *Crenarchaeota* spelen een belangrijke rol in de fixatie van koolstof. De meeste archaea in van de soort zijn *Sulfolobus*. [11] Wat inhoudt dat deze zwavel nodig hebben om te overleven en

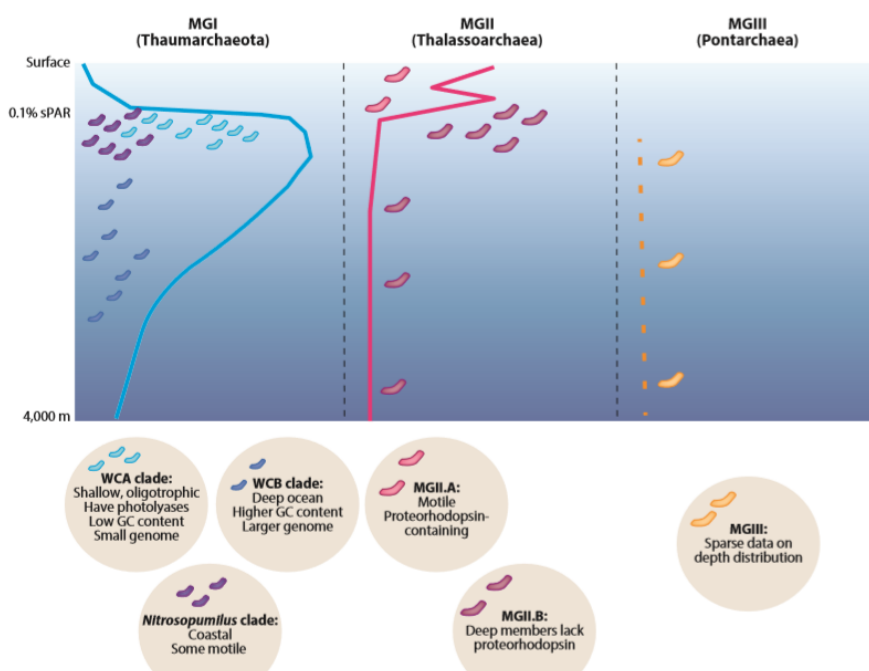


Figuur 2: schematische weergave van het aantal onderzochte mRNA sequenties die gedeeld worden door de *Euryarchaeota*, mesofiele crenarchaeota en hyperthermofiele crenarchaeota. [7]

leven voornamelijk in vulkanische bronnen tussen 75 en 80 °C bij een pH tussen de 2 en 3.

De *thaumarchaeota* zijn een soort archaea die overal aanwezig is in marine plankton. Deze soort archaea verantwoordelijk voor de oxidatie van ammonia in nitriet in de oceaan. [20] Het zijn een van de meest voorkomende microben in de oceaan en het cultiveren hiervan is moeilijk. [9] Toen de *thaumarchaeota* ontdekt werden, werden deze gezien als een soort mesofiele *crenarchaeota*. In figuur 2 is een weergave te zien van een aantal gedeelde eiwitten tussen *thaumarchaeota*, *crenarchaeota* en *euryarchaeota*. Gebaseerd op genoom sequentie van deze archaea onthult dat ze verschillend zijn van de hyperthermofiele *crenarchaeota*. Voorgesteld werd dat de *thaumarchaeota* een derde superphylum werden in het domein van de archaea door Brochier et al. (2008). Dit op basis van het aantal gedeelde eiwitten van de verschillende archaea en de analyse van rRNA. De *thaumarchaeota* stammen niet af van de *crenarchaeota*, maar zijn waarschijnlijk eerder al van elkaar afgetakt.[7]

Archaea worden overal gevonden in de zee, er zijn vier groepen archaea die vaak verwezen worden als planktonische archaea, maar elk hebben een eigen fysiologie en ecologie. Meestal wordt verwezen naar de Marine groep archaea als MG-I tot MG-VI. [18] De *thaumarchaeota* (MG-I) is de enige groep met een gecultiveerde vertegenwoordiger. De marine archaea zijn een belangrijk deel van de kringloop in de oceaan als je kijkt naar het metabolisme en in de hoeveelheden waarin deze aanwezig zijn. De marine groep II worden voornamelijk in de eufotische zone van de oceaan gevonden, en komen minder voor in de diepere delen van de oceaan. [19] Over MGIII en MGIV is nog minder bekend, omdat ze in wat minder grote mate voorkomen in de zee. MGIII is gevonden in de diepere delen van de oceaan. (zie afbeelding 3) [21] De Asgard Archaea hebben de archaea die hun namen gekregen hebben uit de Noorse mythologie. Je hebt de Thorarchaeota, Odinararchaeota, Lokiarchaeota en de Heimdallarchaeota. De Asgard archaea zijn het dichtst gerelateerd aan eukaryoten.



Afbeelding 3: de distributie van de drie grote groepen planktonisch archaea in zeewater. zowel MG I als MGII hebben verschillende clades van ecotypes, die bij voorkeur voorkomen in verschillende delen van de waterkolom. afkortingen: MG: Marine groep, sPAR: surface photosynthetically active radiation, WC: waterkolom.[21]

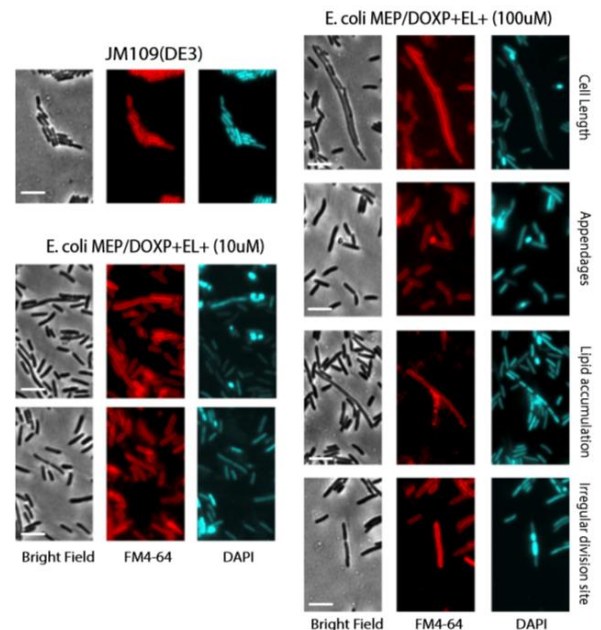
## 2. Relatie Archaea tot andere domeinen

### Bacteriën en Archaea

Archaea en bacteriën zijn beide prokaryoten. Dit betekent dat ze allebei geen celkern hebben. Beide hebben ze een cirkelvormig stuk DNA die beschermd wordt door histonen. Ook produceren beide domeinen ATP op het buitenmembraan van de cel. Daarom werd er eerst gedacht dat archaea en bacteriën onder 1 domein vielen.

Een van de aspecten die archaea en bacteria scheidt is de samenstelling van het celmembraan. Het membraan van archaea bestaat uit glycerol-1-fosfaat ether lipiden, waar bacterie membranen glycerol-3-fosfaat ester lipiden bevatten. Er wordt vaak aangenomen dat de LUCA beide typen lipiden in het membraan had. In het geval dat Luca een membraan had en niet alleen simpele single-chain lipiden. Cafori et al.

experimenteerde met *E.coli* waarin ze een hetero chiraal membraan probeerden te realiseren met beide soorten lipiden. De hypothese was dat een hetero chiraal membraan instabieler zou zijn. Dit zou verklaren dat het hetero chirale membraan van de LUCA zou scheiden in stabielere homo chirale membraan. Resultierend in de lipide kloof die bacteriën en archaea scheidt. Het experiment resulteerde erin dat de vorm van de cel er anders van werd. Dit is te zien in afbeelding 4. In deze resultaten had het resulterende hetero chirale organisme echter een stabielere celmembraan dan de homo chirale variant. Dit wijst erop dat de LUCA niet de lipiden in het celmembraan scheidde door instabiliteit, maar om een andere reden of dat dit willekeurig gebeurde door mutaties. Het is echter moeilijk om een dergelijke hypothese in vivo te testen, aangezien de omstandigheden van vroege evolutie onbekend waren en er een organisme zou moeten zijn met een gemengd membraan. De resultaten worden niet als conclusief beschouwd, omdat ze geen rekening houden met het membraaneiwit gehalte. Er werd alleen aangetoond dat een gemengd membraan mogelijk is. Dit is echter wel met de eiwitten die organismen nu hebben en niet de eiwitten van LUCA. [5]



Afbeelding 4: het effect van gemengde hetero chirale membranen op *E.coli* cellen, gekleurd met FM4-64 en DAPI. De lipide kleuring toont langwerpige en dunnere cellen in de gemanipuleerde stam in vergelijking met de controle. Dubbele kleuring met FM4-64 en DAPI toont de aanwezigheid van aanhangsels omgeven door een lipide laag en de aanwezigheid van DNA. Schaalbalk: 5um [5]

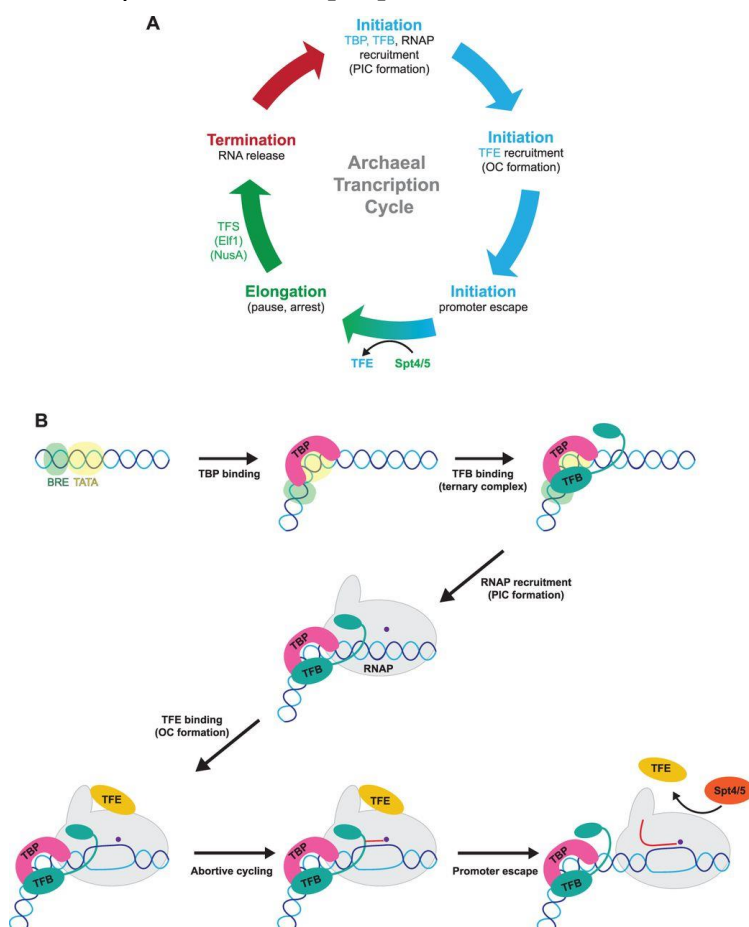
Ribosomaal RNA-sequensen is uitvoerig gebruikt voor de classificatie en identificatie van bacteriën en Archaea. Het vergelijken van het bijna complete 16S rRNA gen sequentie is veel gebruikt als accurate manier om taxonomische relaties te bepalen in prokaryoten. Ook het hele genoom sequensen wordt tegenwoordig veel gebruikt voor de karakterisatie van prokaryoten. Door recent verkregen onafhankelijke genomica (genomen zonder gekweekte representant) zijn er nieuwe microbiële indelingen afgebakend. Zoals de Candidate phyla radiation (CPR) bacteria en de DPANN-archaea (*Diapherotrites*, *Parvarchaeota*,

*Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeote* en *Nanohaloarchaeota*) en Asgard archaea. [10]

## Eukaryoten en Archaea

Nadat de fylogenetische boom scheidt bij LUCA, zijn er twee aftakkingen de Bacteriën en de voorlopen van de archaea en Eukaryoten. Deze voorloper is de Last Eukaryotic Common Ancestor (LECA). De eukaryoten delen meerdere eigenschappen met Archaea.

Een van deze eigenschappen is dat ze op dezelfde manier DNA transcripteren en RNA transleren. De transcriptie van alle organismen wordt gedaan door RNA-polymerase, een eiwit dat DNA afleest en er RNA van maakt. In figuur 3 is een schematische weergave van de transcriptie van archaea. Bacteriën bevatten een simpele RNA-polymerase dat uit 4 polypeptiden bestaat. Eukaryoten en Archaea hebben meerdere RNA-polymerase die meerdere polypeptiden bevatten. De RNA-polymerase van archaea bevatten meer dan 8 polypeptiden en die van eukaryoten 10 tot 12. De relatieve grootte van de eukaryotische polypeptiden zijn vergelijkbaar met die van archaeaal RNA-polymerase. Het Archaeale RNA-polymerase is een dubbel-psy  $\beta$ -barrel enzym. Deze is nauw verwant aan het eukaryotisch RNAPII in termen van de samenstelling, structuur, promotorelementen en transcriptie factoren. Het is vereist voor de initiatie en elongatie fase van de transcriptie. Het begrijpen van de transcriptie kan daarom de sleutel zijn tot het afbakenen van de universeel geconserveerde fundamentele mechanismen van transcriptie en de evolutie van deze archaea/ eukaryote transcriptie eiwitten. [22]



*Figuur 3: (A): De archaeale transcriptie cyclus. deze bestaat uit de initiatie, elongatie en terminatie fase waarbij RNAP wordt geassisteerd door transcriptiefactoren. (B) de transcriptiecascade. TBP (roze) en TFB (groen) binden aan de TATA-box en BRE-promotorelementen, die respectievelijk een ternair complex vormen. RNAP (grijs) wordt dan gerekruteerd om de minimale PIC te vormen. TFE (geel) wordt gerekruteerd naar de PIC en verbetert de overgang tussen de Closed complex en het open complex. Deze treedt gelijktijdig op met de strengscheiding van het DNA en vorming van de transcriptiebel. In de aanwezigheid van NTP-substraten ondergaat RNAP een abortieve initiatie die 3 tot 9 nucleotiden RNA soorten produceert (worden ook wel abortieve transcripten of nano-RNA's genoemd). De verlengingsfactor Spt4/5 (oranje) verplaatst TFE tijdens de promotor afsplitsing of de vroege elongatie. Template en niet template DNA is donkerblauw en lichtblauw. Katalistist Mg-A wordt in het paars weergegeven [22]*

De eiwitsynthese van de Archaea is vergelijkbaar met die van eukaryoten en niet met die van bacteriën. Een groot verschil hierin is dat bacteriën een initiator transfer-RNA hebben dat een gemodificeerd methionine heeft, terwijl eukaryoten en archaea geen gemodificeerd methionine hebben op het initiator tRNA. Eukaryoten hebben zoals bacteriën een celmembraan met glycerol-3-fosfaat ester lipiden. [3]

Topoisomerase is een essentieel enzym dat gevonden is in alle organismen. Het is een enzym die de draaiing uit DNA weghaalt. Een studie met verschillende *thaumarcheota* wees uit dat type IB DNA topoisomerase van deze organismen actief is bij hoge temperaturen in vitro. Dit maakt het de eerste thermofiele topoisomerase IB. Deze is vergeleken met de menselijke tegenhanger in de mitochondriën en de nucleus. Het archaeale enzym heeft dezelfde werking als de eukaryotische enzym, behalve dat het splitsingen specificatiepatroon anders is en het is resistent tegen camptothecinen (topoisomerase inhibitoren). [12] De TACK archaeota waaronder *thaum*, *cren* en *kor* archaeota vallen, heeft na functionele en vergelijkende genoom onderzoek steeds meer unieke eigenschappen. Deze eigenschappen worden alleen door het TACK rijk van de archaea en eukaryoten gedeeld. Hieronder vallen verschillende eiwitten betrokken bij cytokinese, membraan vervorming, morfologie en het hergebruiken van eiwitten. [13]

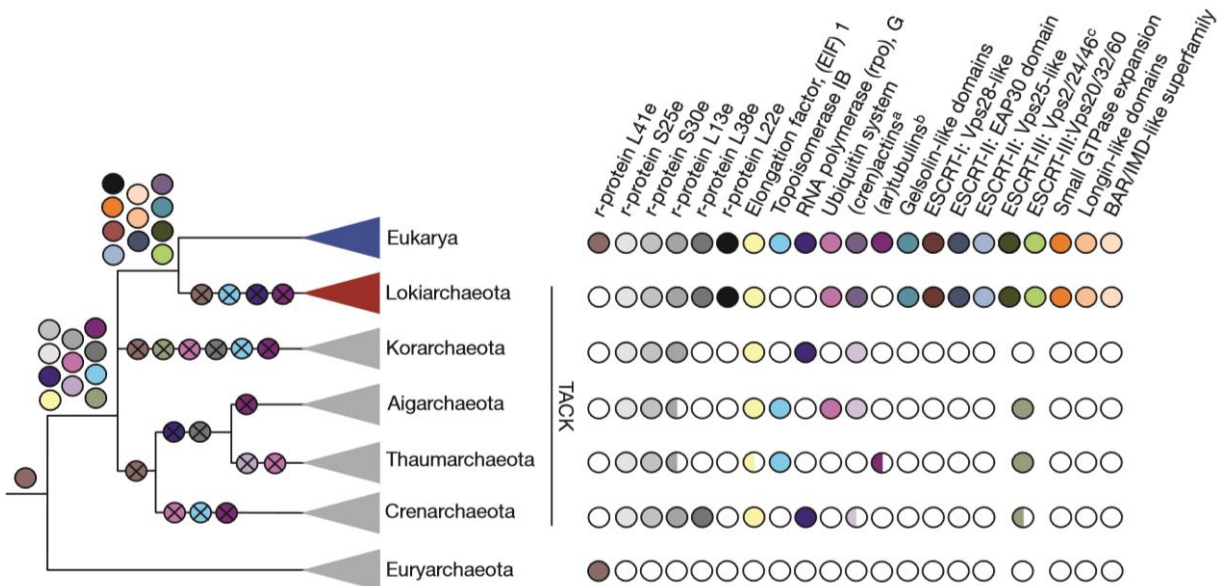
De Asgard archaea worden gezien als de dichtstbijzijnde verwanten aan de eukaryoten, omdat deze specifieke eiwitten bevatten voor eukaryoten (eukaryoot signature proteins (ESP)). Gen onderzoeken wijzen wel uit dat Asgard archaea waarschijnlijk niet aan fagocytose doen op dezelfde manier als eukaryoten dat wel doen. [23]



### 3. Asgard Archaea

Asgard Archaea is een nieuwe stam in het domein van de archaea. Deze groep bestaat uit ongekultiveerde Archaea met namen uit de Noorse mythologie. Waaronder de klassen *lokiarchaeota*, *Thorarchaeota*, *Odinaarchaeota* en *Heimdallarchaeota* vallen.[24] De Asgard Archaea is een zusterstam van de TACK-archaea. Beide vallen ze onder het rijk proteoarchaeota. De Asgard archaea zijn de dichtstbijzijnde prokaryotische verwanten van de Eukaryoten. Dit is bewezen door intensief onderzoek aan archaeale rRNA en eiwitanalyse. [25] Door de vele overeenkomsten wordt er gespeculeerd dat eukaryoten ook een groep zijn binnen de Asgard archaea. Hiervoor zijn meerdere bewijzen gevonden. Beginnende bij de kenmerken van Asgard Archaea.

De eerste beschreven Asgard archaea waren de *Lokiarchaeota* en de *Heimdallarchaeota*. Beschreven door Spang et al. Met uitgebreid fylogenetisch bewijs voor het ontstaan van eukaryoten binnen de Asgard archaea. Het onderzoek naar de *lokiarchaeota* toonde aan dat deze archaea meer eukaryote signature eiwitten (ESP) hebben, dan andere beschreven archaeota. Deze staan weergegeven in figuur 4. [37]

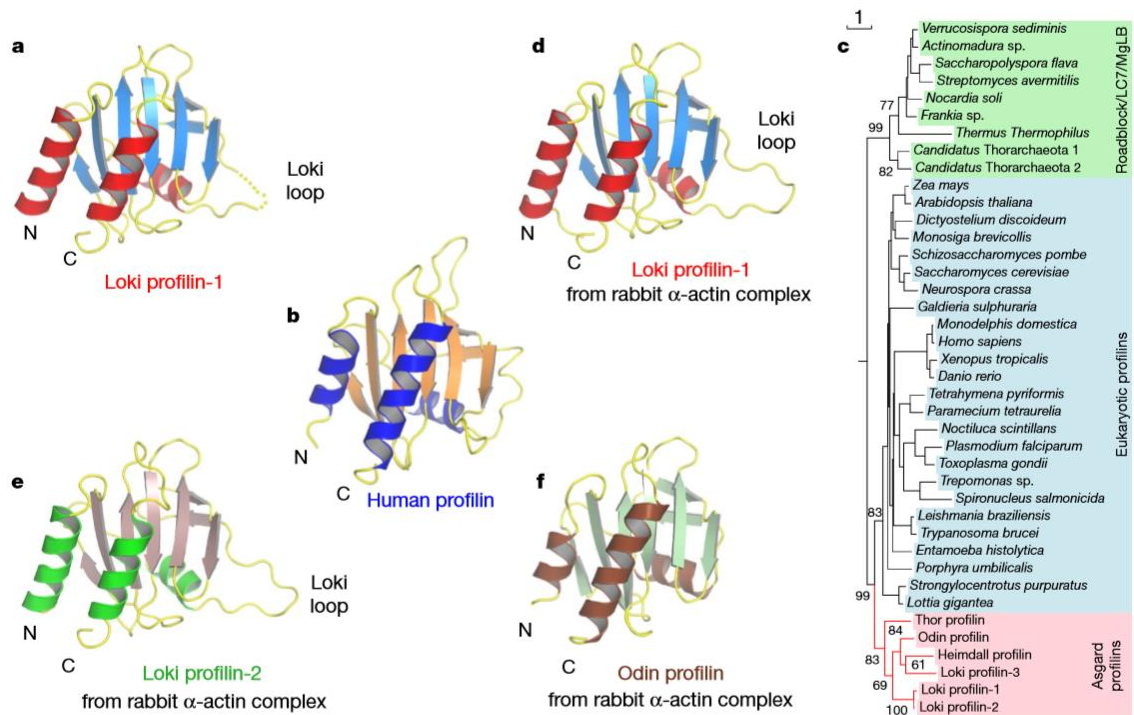


Figuur 4: Schematische weergave van de verdeling van ESPs in de grote archaeale soorten in de boom van het leven. elke ESP is weergegeven als een gekleurde cirkel, het verlies is aangegeven met een kruis. onregelmatige verdeling en afwezigheid van een ESP in een archaeale soort is aangegeven met hal beschaduwde en witte cirkels respectievelijk. [37]

Er is veel controverse over de resultaten omdat er nog gespeculeerd wordt over de contaminatie van de archaeale genomen. Da cunha et al.[26] heeft een hoge contaminatie gevonden in het loki genoom, en speculeert dat de affiliatie tussen eukaryoten en Lokiarchaea een resultaat zijn van genoom reconstructie en fylogenetische analyse. Waarna Spang et al.[28] dit weerlegde met nieuwe resultaten dat er geen significant bewijs gevonden is dat er contaminatie was in het loki genoom van de selectieve genen die zij hadden onderzocht.

*Thorarchaeota* is een rijk binnen de Asgard. Deze archaea zijn nog niet gekweekt, waardoor er weinig bekend is over de leefstijl van de archaeota. Wel is er genomisch onderzoek van deze archaeota gedaan. Deze zijn verkregen uit verschillende lagen in mangrove en wadden sediment. De genomen van deze archaeota suggereren de potentie om organisch materiaal af te breken, anorganisch koolstof te fixeren, sulfaat reductie en acetaat te vormen. Ook zijn *Thorarchaeota* betrokken bij de productie van ethanol, het fixeren van stikstof, nitriet reductie en arsenicum detoxificatie. Van deze archaea wordt aan de hand van het genoom verwacht dat deze anorganische en organische koolstofbronnen te gebruiken voor het metabolisme. [14]

Akil et al.[29] heeft het genoom van Asgard archaea metagenomisch gesequencet. Hieruit bleek dat bepaalde delen van het genoom van Asgard archaea een homolog gen hebben die eukaryotische cellen ook hebben. Dit is een gen voor



Figuur 5: (a) schematische weergave van de structuur van loki profiline-1. de gedeeltelijk ongeordende vergrootte loop is aangegeven met een stippellijn. N en C geven de respectievelijke terminale einden aan. (b) de structuur van menselijk profiline-1 voor vergelijking. (RCSB-proteïne databank (PDB) code: 1FIL) (c) profiline bepaalde fylogenetische boom van de Asgard en eukaryotische profiline berekend door op structuur gebaseerde alignment die gebruikmaakt van de Asgard profiline structuur in dit figuur. Eiwit sequenties van de roadblock/LC7/MgLB groep zijn gebruikt als een buitengroep, omdat hun structuur vergelijkbare topologie heeft als die van profiline. (d-f) Loki profiline-1 (d) loki profiline (e) en Odin profiline (f) structuren verkregen van het konijn  $\alpha$ -actine complex structuren.[29]

profilin. (zie figuur 5) Een eiwit dat actine bindt en de activiteit van actine reguleert. Actine is een eiwit dat belangrijk is voor het cytoskelet van de cel door microfilamenten te vormen. In het onderzoek van Akil et al. Is er bewezen dat Asgard archaea een functioneel gereguleerd actine cytoskelet heeft gereguleerd door profiline. Loki en Odin profiline zijn zo gevouwen dat de ook instaat zijn om interacties te hebben met actine van konijnen. De eukaryotische actine

polymeriseert in aanwezigheid van Asgard profiline, maar hebben geen interactie met polyprolinemotieven. Dit wijst erop dat de profiline-polyproline interactie later is geëvolueerd. De resultaten van dit onderzoek suggereren dat Asgard archaea een primair, polair, profiline-gereguleerd actine systeem bezitten, dat gelokaliseerd kan zijn in membranen vanwege de gevoeligheid van Asgard profiline voor fosfolipiden. [29]

Asgard archaea zijn sterk gerelateerd aan eukaryoten. Ze delen verschillende homologe genen en eiwitten waarvan eerst werd gedacht dat deze specifiek waren voor eukaryoten. Deze fylogenetische affiniteit met eukaryoten wordt veel geïnterpreteerd dat Asgard Archaea "eukaryoot-achtige archaea" zijn, en dat eukaryoten geëvolueerd zijn binnen het domein van de archaea. Het beter begrijpen van de Asgard archaea kan helpen met het begrijpen van de eukaryogenese en de vroege evolutie in de fylogenetische boom van het leven. [35]

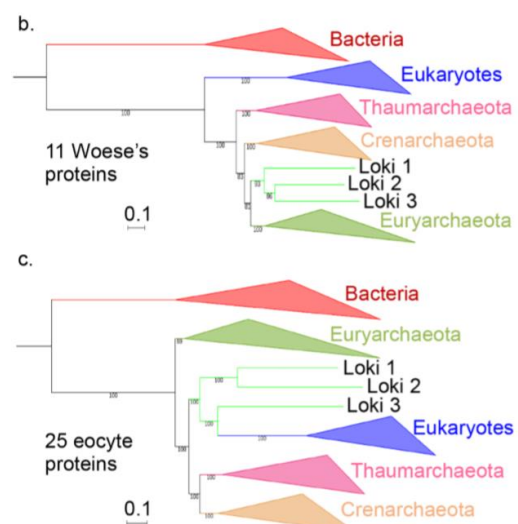


## 4. De fylogenetische boom

Sinds de fylogenetische boom van het leven voor het eerst werd gemaakt is deze steeds verandert. Na elke nieuwe ontdekking op het gebied van evolutie en gen onderzoek kan het zijn dat de boom niet kloppend lijkt te zijn. Micro-organismen hebben een belangrijke rol in de ecosystemen op aarde, maar het grootste gedeelte van de biodiversiteit en ecologie van de microbiële wereld is nog niet bekend.

Door de vooruitgangen in genoom sequencing technologie groeit de microbiële genoom database (MBGD) exponentieel. Dit onthult de grote diversiteit van de microbiële wereld doordat er steeds nieuwe genomen worden gesequencet en door het vergelijken van genomen van dezelfde soort. De database bevat vergelijkbare genen gebaseerd op orthologie van bacteria, archaea en eencellige eukaryoten. Met behulp van de database kunnen nieuw gesequencete genen snel vergeleken worden met al bekende genen van andere organismen. Resultierend in een beter begrip van hoe en wanneer de genen geëvolueerd zijn. [31] De interactieve tree of life is een online tool waar de huidige fylogenetische boom van het leven weergeeft. Deze is ontwikkeld voor een goede visualisatie van de boom van het leven waarin nieuwe data makkelijk verwerkt kan worden. [38] Door het vergelijken van genen zijn er meerdere discussies over hoe de fylogenetische boom eruit hoort te zien. Door het gen onderzoek zijn er uiteindelijk meerdere hypothesen geopperd. De eerste die oppert Archaea en Eukarya zuster groepen zijn die een gemeenschappelijke voorouder hebben. De tweede hypothese waarin Eukarya zijn geëvolueerd binnenin de Archaea. Deze hypothese stelt dat de fylogenetische boom weer 2 domeinen zou moeten hebben in plaats van drie. [27] Ook wordt er gespeculeerd dat Archaea de eerste levensvorm waren in plaats van bacteriën. Dan heb je ook nog de hypothese dat eukaryoten een gevolg zijn van een fusie tussen een archaea en een bacteriecel.

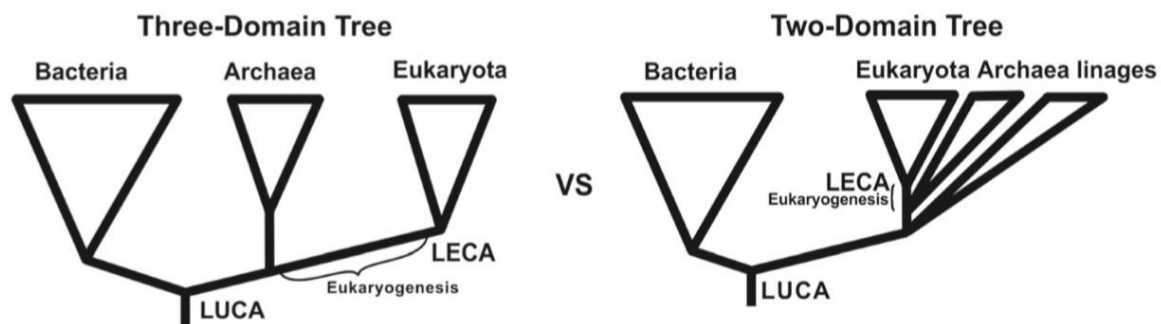
De eerste hypothese over de fylogenetische boom is de canonical theorie. Deze is de momenteel algemeen geaccepteerde theorie over de fylogenetische boom, sinds Woese het derde domein beschreef. Deze hypothese is dat er drie domeinen zijn, de Bacteriën, Archaea en eukaryoten. Waarin bacteriën de eerste levensvormen zijn die zijn ontstaan. Ook stelt deze theorie dat chloroplasten en mitochondriën van bacteriële afkomst zijn en dat de eukaryotische nucleus niet afstamt van bacteriën of archaea. Deze theorie wordt ondersteund door compositionele statistieken, een analysemethode gebaseerd op evolutionaire spaarzaamheid (behoud van genen door de evolutie heen) op basis van fylogenetische DNA-alignementen van universele genen. DaCuhna et al. heeft 36 universele eiwitten geanalyseerd in *Lokiarchaea*, *Thorarchaeota* en eukarya. Dit zijn 11 van Woese's eiwitten en 25 eiwitten uit de eocyte theorie. (zie figuur



Figuur 6: vergelijking van de verschillende subsets van 36 universele eiwitten. (b) maximum likelihood van de fylogenetische boom van de aansluiting van Woese's 11 eiwitten. (3,499 posities) (c) maximum likelihood van de fylogenetische boom op basis van de 25 eocyte proteïnen (4,868 posities). [26]

6) De analyse van DaCuhna et al. toont aan dat de specifieke relatie tussen eukaryoten en *Lokiarchaea* waarschijnlijk een artefact is van genomreconstructie en fylogenetische analyse. Het werk benadrukt het belang van zorgvuldige analyse van individuele eiwitgegevens voordat er conclusies worden getrokken uit fylogenieën op basis van aaneenschakelingen. De resultaten gaven aan dat de *Lokiarchaea* overeenkomen met een nieuwe monofyletische archaeale afstammingszustergroep met euryarchaeota en niet met eukaryoten. [26] De canonical theorie is echter gebaseerd op spaarzaamheid en afstandsmethoden die onrealistisch zijn, omdat ze de heterogeniteit van de samenstelling en het variabele evolutionaire snelheid niet beschouwen.

De eocyte theorie stelt dat er twee domeinen zijn; de Bacteriën en Archaea. Deze theorie stelt dat *Crenarchaeota* en eukaryoten een vergelijkbare ribosoom structuur hebben en dat eukaryoten waarschijnlijk afstammen van een voorouderlijke *crenarchaeota* of *thaumarchaeota*. Deze theorie wordt bevestigd doordat de meeste genen die te maken hebben met DNA-replicatie, transcriptie en translatie in archaea gerelateerd zijn aan de eukaryotische tegenhangers. [39] Er zijn momenteel veel discussies gaande dat er contaminatie zat in de gesequente archaeale genomen. Totdat deze organismen zijn gekweekt en onderzocht op het lab blijft deze controversie bestaan. [27] Het grootste probleem met deze theorie is dat archaea glycerol-ether lipiden hebben in het membraan en eukaryoten hebben dat niet. Dit zou dan in proto-eukaryoten geëvolueerd moeten zijn naar een bacterieel-achtig membraan met glycerol ester lipiden. Er is nog steeds geen overeenstemming over de oorsprong van eukaryoten, meer onderzoek is gewenst. [40]



Figuur 7: schematische weergave van een 2 domein en 3 domein fylogenetische boom. deze vergelijking laat de verschillende topologiën zien van de boom en de posities van de eukaryogenese in twee hypothesen. [40]

De fusie theorie stelt dat eukaryoten zijn ontstaan door de fusie van een archaeon en een bacterie. Dit gebeurt wanneer een cel binnenin het cytoplasma van een andere soort gaan leven, resulterend in een fusie van het genoom. De nucleus first hypothese stelt dat de nucleus als eerste in prokaryoten is geëvolueerd. Gevolgd door de fusie van een cel met een bacterie die later de mitochondria is geworden. Deze theorie verklaart de dubbele membranen die zijn gevonden in mitochondria en chloroplasten. [34] Alle mitochondriën stammen af van een gezamenlijk voorouderlijk organel. Die zelf afstamt van een endosymbiotisch alphaproteobacterium geïntegreerd in een host cel, die waarschijnlijk gerelateerd is aan Asgard Archaea. De transitie van een endosymbiotische bacterie naar een permanent organel, heeft een enorme hoeveelheid evolutionaire veranderingen moeten doorgaan. Zoals het verlies en winst van eiwitten, membraan transporters, integratie van metabolisme en reproductie. Er is nog veel controversie over de originele endosymbiont en de

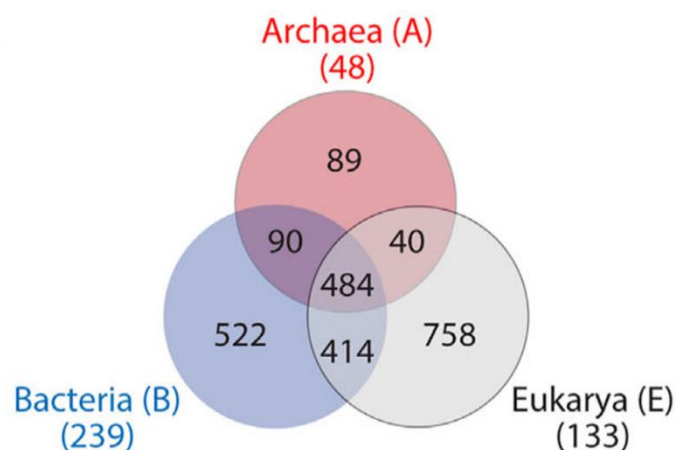
eerste interacties met de host. Het evolutionaire proces omvat duizenden evolutionaire stappen. Interacties tussen proto-eukaryoten en proto-mitochondria, die ondertussen al zijn uitgestorven, vallen ook onder het evolutionaire proces. Voor het ontstaan van eukaryoten was de endosymbiose met mitochondria onmisbaar. Er wordt nog steeds vooruitgang gemaakt om te begrijpen hoe de mitochondriële biogenese, deling en metabolisme zijn gecoördineerd met de rest van de cel. Ze spelen een belangrijke rol in de eukaryote boom van het leven [32]

De vierde en laatste hypothese is de archaea first hypothese. Deze theorie stelt dat archaea de eerste levensvormen waren in plaats van bacteriën. Staley et al. (2018) werkte deze hypothese uit. Door vergelijkende en fylogenetische analyse van moleculaire en cellulaire eigenschappen die evolutionair behouden zijn. moleculaire eigenschappen zijn onder andere goed bewaarde RNA-moleculen zoals tRNA, 5S rRNA, RNase en het proteoom. Onder de cellulaire eigenschappen vallen bijvoorbeeld het kenmerkende ether gebonden vetzuren celmembraan van de archaea.

Als de Archaea de eerste vertakking is na de LUCA, verklaart dat het verschillende celmembraan, die bij de Eukaryoten en Bacteriën nog hetzelfde is. Hierdoor is er 1 oorsprong van de membraan diversificatie, waar er bij de andere theorieën meerdere zou moeten zijn. Ook zijn er bepaalde pvc-bacteriën met een endomembraan nucleaire structuur zoals eukaryoten ook hebben. Als de bacteriën en eukaryoten samen zijn geëvolueerd zou dit verklaren dat beide een nucleus hebben. [33] Ook in deze theorie is het zo dat het membraan en de nucleus niet op verschillende plekken in de evolutie veranderd zijn, maar op 1 punt in de evolutie.

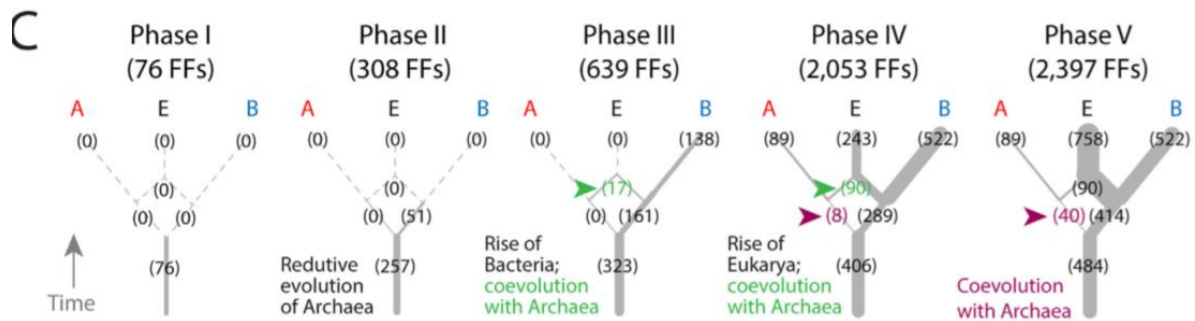
Eiwitten zijn gemaakt uit verschillende componenten, de eiwit domeinen. Dit zijn structureel, functioneel en evolutionaire delen. Alle organismen delen een grote groep universele eiwitten. Eiwitdomein structuren hebben een groot historisch geheugen dat waarde heeft voor de evolutionaire historie.

Er kan een tijdlijn gemaakt worden van de gedeelde eiwit families, om de oorsprong en evolutie van eiwitten te bepalen. De tijdlijn van eiwit fold families (FF) kan worden ingedeeld in 5 fases. De eerste fase is de eerste ophoping van universele eiwitfamilies. De tweede fase laat zien dat sommige families verloren gaan in de archaea. In de derde fase vormen de eerste bacterie specifieke eiwit domeinen en de eerste eiwit families die alleen voorkomen in Archaea en bacteriën. In de vierde fase komen de eerste Archaea specifieke en eukaryoot specifieke eiwit families. Ook vormen hier de eerste eiwit domein families specifiek voor archaea en eukaryoten. De laatste fase is het heden. In figuur 8 zijn de verschillende fases weergegeven op een versimpelde fylogenetische boom. De opeenhoping van eiwit domein families kunnen uitgetekend worden op een simpele fylogenetische boom. Deze laat een tijdlijn zien die de archaea first scenario bevestigd. Omdat er groepen zijn die eiwitten in een later stadium delen



Figuur 8: Een diagram die laat zien hoe SCOP fold families (FF) van structurele eiwitdomeinen zijn verdeeld in Archaea, bacteriën en eukaryoten.[36]

suggereert dit dat er horizontale uitwisseling van genetisch materiaal was en co-evolutie van organismen.[36]



Figuur 9: Model van de diversificatie van eiwitstructuurdomeinen in proteomen die rechtstreeks zijn afgeleid van fylogenetisch gegevens. De netwerkdiagrammen tonen de evolutionaire accumulatie van FFs langs de 5 fasen van de evolutionaire tijdlijn. De grote fylogenetische splitsingen zijn alleen compatibel met de archaea first hypothese. De groene en paarse pijlen geven horizontale co-evolutie aan.

Er zijn een heleboel theorieën over hoe de eerste levensvormen zijn geëvolueerd uit LUCA. LUCA was niet een organisme, maar een gemeenschap van primitieve cellen. De drie domein hypothese was voornamelijk gedaan om te benadrukken dat de archaea een fundamenteel andere levensvorm zijn. Immers werden ze daarvoor gekoppeld aan de bacteriën. Nieuwe onderzoeken wijzen uit dat archaea en eukaryoten veel gemeen hebben. De relatie tussen Eukaryoten en Asgard archaea kan echter niet op zichzelf het debat sluiten over een 2 of 3 domeinen boom van het leven. [41] Het eukaryotische genoom bevat archaeale, bacteriële en eukaryotische specifieke genen. Het oplossen van dit debat ligt in het identificeren van de bron van archaea respectievelijk aan bacteria en LUCA. Ook zouden de archaea gekweekt moeten worden zodat deze beter onderzocht kunnen worden. [40]

## Conclusie/ discussie

De oorsprong en evolutie van de Archaea, bacteria en eukaryoten blijft een controversieel onderwerp en eentje van een lange discussie. De woeseian 3 domeinen theorie, waar eukaryoten als een zusterdomein naast de archaea zijn geëvolueerd, concurreert met de nieuwe 2 domeinen theorie (eocyte). De theorie waar de eukaryoten een vertakking zijn binnen het domein van de archaea. Het voortdurende debat heeft de laatste drie decennia bewezen dat een verfijnde en betere fylogenetische methode moet worden gebruikt om goede conclusies te kunnen trekken over welke hypothese juist is.

De nieuw opkomende archaeale lijnen (Asgard) met talrijke eukaryoot-achtige kenmerken zoals membraantransport, cel compartimentalisatie staan fylogenetisch gezien het dichtst bij eukaryoten. Deze bevindingen geven de evolutionaire geschiedenis weer van een vroege archaeon tot een meer complexe archaeon met protoeukaryotische kenmerken. Hierdoor ontstaan er steeds meer aanwijzingen om de vroege evolutie van het leven te begrijpen.

Fylogenomisch onderzoek van moleculaire processen die evolutionair bewaard zijn gebleven, zoals de structuur van eiwitdomeinen suggereert dat archaea ook het eerste domein van het leven zou kunnen zijn.

Elke van de theorieën is gebaseerd op wetenschappelijke onderzoeken. Ook al zijn sommige hypothese binnen de theorieën niet te testen, omdat de voorouderlijke organismen niet meer bestaan. Dat alle organismen zijn geëvolueerd uit LUCA dat waarschijnlijk een gemeenschap was van primitieve cellen is duidelijk. Alleen misschien zijn meerdere van deze cellen samen verder geëvolueerd. Ook is er waarschijnlijk horizontale gen overdracht geweest. Waardoor homologe genen in de verschillende domeinen niet per se van een gemeenschappelijke voorouder gekomen zijn, maar ook later overgedragen kunnen zijn.

De fylogenetische boom van het leven is vaak veranderd naarmate er meer onderzoek gedaan wordt. Het is van 2 naar 3 domeinen gedaan, en nu is er een debat over of het toch weer 2 domeinen moeten zijn. Ook is de theorie dat archaea de eerste levensvormen waren in plaats van bacteriën een vrij logische conclusie als je kijkt naar de evolutie van bepaalde kenmerken.

Er kunnen nog geen definitieve conclusies worden getrokken over de vroege evolutie van het, omdat er niemand getuige was van de vroege evolutie. Ook zijn er veel organismen nog niet gekweekt, dus is er ook nog geen zuiver genoom van. Er zou nog meer experimenteel evolutionair onderzoek uitgevoerd moeten worden en onderzoeken als next gen sequencing, genotypering en functionele karakterisatie.

## Referenties

1. Schematische afbeelding fylogenetische boom in de inleiding.  
[http://en.citizendium.org/wiki/File:Tree\\_phylogeny\\_3\\_domain.gif](http://en.citizendium.org/wiki/File:Tree_phylogeny_3_domain.gif)
2. Castelle, C. J., & Banfield, J. F. (2018). Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life. *Cell*, 172(6), 1181-1197. doi: S0092-8674(18)30160-0 [pij]
3. Di Giulio, M. (2019). The universal ancestor, the deeper nodes of the tree of life, and the fundamental types of primary cells (cellular domains). *Journal of Theoretical Biology*, 460, 142-143. doi: S0022-5193(18)30496-X [pii]
4. Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088-5090.
5. Caforio, A., Siliakus, M. F., Exterkate, M., Jain, S., Jumde, V. R., Andringa, R. L. H., ... van der Oost, J. (2018). Converting into an archaeobacterium with a hybrid heterochiral membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(14), 3704-3709. [pnas.1721604115]. DOI: 10.1073/pnas.1721604115
6. Woese CR. 2004. The archaeal concept and the world it lives in: a retrospective. *Photosynthesis Research* 80(1-3):361-372 DOI 10.1023/b:pres.0000030445.04503.e6.
7. Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., & Forterre, P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: Proposal for a third archaeal phylum, the thaumarchaeota. *Nature Reviews.Microbiology*, 6(3), 245-252. doi:10.1038/nrmicro1852 [doi]
8. Hamerly, T., Tripet, B., Wurch, L., Hettich, R. L., Podar, M., Bothner, B., & Copie, V. (2015). Characterization of fatty acids in crenarchaeota by GC-MS and NMR. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, 2015, 472726. doi:10.1155/2015/472726 [doi]
9. Luo, H., Sun, Y., Hollibaugh, J. T., & Moran, M. A. (2016). Low genome content diversity of marine planktonic thaumarchaeota. *Environmental Microbiology Reports*, 8(4), 501-507. doi:10.1111/1758-2229.12417 [doi]
10. Mukai, T., Crnkovic, A., Umehara, T., Ivanova, N. N., Kyrpides, N. C., & Soll, D. (2017). RNA-dependent cysteine biosynthesis in bacteria and archaea. *Mbio*, 8(3), 10.1128/mBio.00561-17. doi:e00561-17 [pii]
11. Schleper, C., Jurgens, G., & Jonuscheit, M. (2005). Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews.Microbiology*, 3(6), 479-488. doi:nrmicro1159 [pii]
12. Dahmane, N., Gabelle, D., Delmas, S., Criscuolo, A., Eberhard, S., Desnoves, N., . . . Sezonov, G. (2016). topIb, a phylogenetic hallmark gene of thaumarchaeota encodes a functional eukaryote-like topoisomerase IB. *Nucleic Acids Research*, 44(6), 2795-2805. doi:10.1093/nar/gkw097 [doi]
13. Guy, L., & Ettema, T. J. (2011). The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 19(12), 580-587. doi:10.1016/j.tim.2011.09.002 [doi]
14. Liu, Y., Zhou, Z., Pan, J., Baker, B. J., Gu, J. D., & Li, M. (2018). Comparative genomic inference suggests mixotrophic lifestyle for thorarchaeota. *The ISME Journal*, 12(4), 1021-1031. doi:10.1038/s41396-018-0060-x [doi]
15. Hoshika, S., Leal, N. A., Kim, M. J., Kim, M. S., Karalkar, N. B., Kim, H. J., . . . Benner, S. A. (2019). Hachimoji DNA and RNA: A genetic system with eight building blocks. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6429), 884-887. doi:10.1126/science.aat0971 [doi]

16. Niederberger, T. (2017). Archaea. *Encyclopædia Britannica, Encyclopædia Britannica, inc.*
17. Hedlund, B. P., Murugapiran, S. K., Alba, T. W., Levy, A., Dodsworth, J. A., Goertz, G. B., . . . Woyke, T. (2015). Uncultivated thermophiles: Current status and spotlight on 'aigarchaeota'. *Current Opinion in Microbiology*, *25*, 136-145. doi:10.1016/j.mib.2015.06.008 [doi]
18. Haro-Moreno, J. M., Rodriguez-Valera, F., Lopez-Garcia, P., Moreira, D., & Martin-Cuadrado, A. B. (2017). New insights into marine group III euryarchaeota, from dark to light. *The ISME Journal*, *11*(5), 1102-1117. doi:10.1038/ismej.2016.188 [doi]
19. Rinke, C., Rubino, F., Messer, L. F., Youssef, N., Parks, D. H., Chuvochina, M., . . . Hugenholtz, P. (2018). A phylogenomic and ecological analysis of the globally abundant marine group II archaea (ca. poseidoniales ord. nov.). *The ISME Journal*, doi:10.1038/s41396-018-0282-y [doi]
20. Oton, E. V., Quince, C., Nicol, G. W., Prosser, J. I., & Gubry-Rangin, C. (2016). Phylogenetic congruence and ecological coherence in terrestrial thaumarchaeota. *The ISME Journal*, *10*(1), 85-96. doi:10.1038/ismej.2015.101 [doi]
21. Santoro, A. E., Richter, R. A., & Dupont, C. L. (2018). Planktonic marine archaea. *Annual Review of Marine Science*, doi:10.1146/annurev-marine-121916-063141 [doi]
22. Fouqueau, T., Blombach, F., Cackett, G., Carty, A. E., Matelska, D. M., Ofer, S., . . . Werner, F. (2018). The cutting edge of archaeal transcription. *Emerging Topics in Life Sciences; Portland Press Ltd*, doi:10.1042/ETLS20180014
23. Burns, J. A., Pittis, A. A., & Kim, E. (2018). Publisher correction: Gene-based predictive models of trophic modes suggest asgard archaea are not phagocytotic. *Nature Ecology & Evolution*, *2*(4), 751-018-0520-8. doi:10.1038/s41559-018-0520-8 [doi]
24. Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Backstrom, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., . . . Ettema, T. J. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, *541*(7637), 353-358. doi:10.1038/nature21031 [doi]
25. Cai, Mingwei & Liu, Yang & Zhou, Zhichao & Yang, Yuchun & Pan, Jie & Gu, Ji-Dong & Li, Meng. (2018). Asgard archaea are diverse, ubiquitous, and transcriptionally active microbes. 10.1101/374165.
26. Da Cunha, V., Gaia, M., Gadelle, D., Nasir, A., & Forterre, P. (2017). Lokiarchaea are close relatives of euryarchaeota, not bridging the gap between prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Genetics*, *13*(6), e1006810. doi:10.1371/journal.pgen.1006810 [doi]
27. Spang, A., Eme, L., Saw, J. H., Caceres, E. F., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Lombard, J., . . . Ettema, T. J. G. (2018). Asgard archaea are the closest prokaryotic relatives of eukaryotes. *PLoS Genetics*, *14*(3), e1007080. doi:10.1371/journal.pgen.1007080 [doi]
28. Da Cunha, V., Gaia, M., Nasir, A., & Forterre, P. (2018). Asgard archaea do not close the debate about the universal tree of life topology. *PLoS Genetics*, *14*(3), e1007215. doi:10.1371/journal.pgen.1007215 [doi]
29. Akil, C., & Robinson, R. C. (2018). Genomes of asgard archaea encode profilins that regulate actin. *Nature*, *562*(7727), 439-443. doi:10.1038/s41586-018-0548-6 [doi]
30. Barberan, A., Fernandez-Guerra, A., Auguet, J. C., Galand, P. E., & Casamayor, E. O. (2011). Phylogenetic ecology of widespread uncultured



- clades of the kingdom euryarchaeota. *Molecular Ecology*, 20(9), 1988-1996. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05057.x [doi]
31. Uchiyama, I., Mihara, M., Nishide, H., Chiba, H., & Kato, M. (2018). MGD update 2018: Microbial genome database based on hierarchical orthology relations covering closely related and distantly related comparisons. *Nucleic Acids Research*, doi:10.1093/nar/gky1054 [doi]
  32. Roger, A. J., Munoz-Gomez, S. A., & Kamikawa, R. (2017). The origin and diversification of mitochondria. *Current Biology : CB*, 27(21), R1177-R1192. doi:S0960-9822(17)31179-X [pii]
  33. Hendrickson, H. L., & Poole, A. M. (2018). Manifold routes to a nucleus. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2604. doi:10.3389/fmicb.2018.02604 [doi]
  34. Keeling, P. J. (2004). Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *American Journal of Botany*, 91(10), 1481-1493. doi:10.3732/ajb.91.10.1481 [doi]
  35. Fournier, G. P., & Poole, A. M. (2018). A briefly argued case that asgard archaea are part of the eukaryote tree. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1896. doi:10.3389/fmicb.2018.01896 [doi]
  36. Staley, J. T., & Caetano-Anolles, G. (2018). Archaea-first and the co-evolutionary diversification of domains of life. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 40(8), e1800036. doi:10.1002/bies.201800036 [doi]
  37. Spang, A., Saw, J. H., Jorgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., . . . Ettema, T. J. G. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 521(7551), 173-179. doi:10.1038/nature14447 [doi]
  38. Letunic, I., & Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W242-5. doi:10.1093/nar/gkw290 [doi]
  39. Williams, T. A., Foster, P. G., Nye, T. M., Cox, C. J., & Embley, T. M. (2012). A congruent phylogenomic signal places eukaryotes within the archaea. *Proceedings Biological Sciences*, 279(1749), 4870-4879. doi:10.1098/rspb.2012.1795 [doi]
  40. Zhou, Z., Liu, Y., Li, M., & Gu, J. D. (2018). Two or three domains: A new view of tree of life in the genomics era. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3049-3058. doi:10.1007/s00253-018-8831-x [doi]
  41. Harish, A. (2018). What is an archaeon and are the archaea unique? *Peerj*, 6, e5770. doi:10.7717/peerj.5770 [doi]