



**Programa de Doctorado en
Investigación Espacial y Astrobiología (D443)**

El virus *Sulfolobus* Spindle-shaped Virus 8 (SSV8) actúa como factor de estrés en *Sulfolobus solfataricus* P2 y regula al alza la producción de proteínas de choque térmico (HSP)

**Tesis Doctoral presentada por
Jorge Enrique Bueno Prieto**

Directores:

Dr. Rubén Michael Ceballos

Dr. Víctor Parro García

Alcalá de Henares, Septiembre 27 de 2022

A solid blue horizontal bar spans the width of the page at the bottom.

DECLARACIÓN

Declaro que la tesis titulada “**El virus Sulfolobus Spindle-shaped Virus 8 (SSV8) actúa como factor de estrés en *Sulfolobus solfataricus* P2 y regula al alza la producción de proteínas de choque térmico (HSP)**” presentada por mí, para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Alcalá es un trabajo realizado por mí bajo la supervisión de los Doctores Dr. Rubén Michael Ceballos de la Universidad de Arkansas y Dr. Víctor Parro García, del Centro de Astrobiología (CAB-INTA).

Asimismo, declaro que el trabajo relatado en esta tesis no ha sido presentado ni será presentado, ni en parte ni en su totalidad, para la obtención de ningún otro título o diploma en este instituto o en cualquier otro instituto o universidad.

Alcalá de Henares, Septiembre 27 de 2022.

“La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos: se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible.”

Carl Sagan

Agradecimientos

Con todo el amor a mi hijo Samuel, por tu valentía, apoyo y paciencia durante el tiempo que estuve fuera de casa dedicado a este trabajo.

Gracias a mi esposa Laura, tu apoyo, respaldo y amor fueron el sustento para estar lejos de casa.

Celeste, gracias por iluminar con tu llegada a nuestra familia.

A Dr. Michael Ceballos, por aceptar acompañarme en esta idea de aportar a la Astrobiología abriendo las puertas de su laboratorio y permitirme hacer ciencia bajo su orientación y conocimiento, agradezco también el respaldo y compañía de su Familia.

A Dr. Víctor Parro, por su respaldo y aceptación de dirigirme en esta iniciativa del proyecto de tesis y a través de su experiencia ayudarme en la formación como científico.

A los miembros del equipo del laboratorio de Dr. Ceballos: Dr. Basha y Yeasin por su colaboración en las actividades de este proyecto.

A John Afanador por su compañía y amistad durante la última etapa de actividades de este proyecto en campo.

A Dra. Elizabeth Padilla por su invaluable ayuda y orientación en este trabajo.

A mi hermana Blanca, Yoly, Raulito, por respaldarme en casa durante mi estadía en el exterior.

A Lucy, Marty, Serafín, Tobita, Aldo y Potter por su incondicional compañía a nuestra familia.

A Meowth Sanderz, inspiraste el camino de la ciencia y la amistad entre felino y humano.

A todo el equipo del Instituto de Astrobiología de Colombia, porque la vida no tiene fronteras en el Universo.

A mi madre Rosalba, siempre has estado y estarás conmigo.

Tabla de contenido

Lista de tablas	10
Lista de figuras	11
Resumen	14
Summary	16
Introducción	14
1 Producción de proteínas de choque térmico (HSP) como respuesta al estrés	18
1.1 Funciones de las HSP en el plegamiento de proteínas	23
1.2 Rol evolutivo de las proteínas de choque térmicos HSP: Chaperoninas del grupo I y II .	24
1.2.1 Las chaperoninas del grupo I	25
1.2.2 Chaperoninas del grupo II.....	26
1.3 Importancia evolutiva y factores estrés en <i>Sulfolobus</i>	29
1.3.1 Situaciones de estrés en Sulfolobales.....	30
1.4 Dominio Archaea: representante ancestral y actual de organismos extremos	33
1.4.1 Características de <i>Sulfolobus</i> como modelo de estudio	39
1.5 Virus en Archaea y específicos en Sulfolobales	44
1.5.1 <i>Sulfolobus Spindle-shaped Virus</i> (SSV)	46
1.6 Características de la interacción virus-hospedador	49
2 Hipótesis y objetivos	53
2.1 Hipótesis.....	53
2.2 Objetivos	54
3 Materiales y métodos	55
3.1 Cepas y medios de cultivo.....	55
3.1.1 Cepas de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	55

3.1.2	Cepa de virus <i>Sulfolobus Spindle-shaped</i> SSV8.....	55
3.2	Medios de cultivo.....	55
3.2.1	Cultivos de cepas	56
3.2.2	Cultivo de Cepa de virus y extracción	58
3.3	Preparación en las cajas de Petri y medio sólido	59
3.3.1	Verificación de virus por ensayo de Halo.....	60
3.3.2	Titulación por virus: unidades formadoras de halos (conteo de virus)	61
3.4	Determinación de las curvas de crecimiento.....	62
3.5	Ensayos al estrés por choque térmico	63
3.6	Ensayos al estrés por infección con virus SSV8	64
3.7	Extracción de proteínas.....	66
3.7.1	Centrifugación.....	66
3.7.2	Suspensión y lisis celular	66
3.7.3	Concentración del lisado.....	67
3.7.4	Purificación de proteínas de choque térmico por tratamiento de calor	67
3.7.5	Ensayo de Bradford.....	67
3.8	Detección de proteínas	68
3.8.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	68
3.8.2	Preparación del gel.....	69
3.8.3	Preparación de las muestras	70
3.8.4	Electroforesis	71
3.8.5	Visualización de bandas.....	72
3.8.6	Análisis de geles por ImageJ.....	73
3.9	Expresión de RNA para HSP α y HSP β	74
3.9.1	Aislamiento de RNA.....	74

3.9.2	qPCR	80
4	Resultados	82
4.1	Evaluación de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 en condiciones de estrés térmico	82
4.1.1	Estrés por choque térmico para <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2.....	82
4.1.2	Crecimiento bajo choque térmico a 80 °C	82
4.1.3	Crecimiento bajo choque térmico a 85 °C	84
4.1.4	Crecimiento bajo choque térmico a 90 °C	85
4.1.5	Cuantificación de proteínas generadas en estrés por choque térmico.....	87
4.2	Estrés por infección con virus SSV8 <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2.....	95
4.2.1	Fases del crecimiento de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 bajo infección viral por SSV8	98
4.3	Producción de proteínas de choque térmico (HSP) por infección SSV8 en <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	102
4.3.1	Cuantificación de proteínas.....	105
4.4	Monitorización de la transcripción de genes <i>thsA</i> y <i>thsB</i> por qRT-PCR en las células sometidas a estrés térmico y viral	114
4.5	Transcripción de los genes de chaperoninas HSP α y HSP β en los diferentes escenarios de estrés en <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2.....	119
4.5.1	En choque térmico	119
4.5.2	En infección por SSV8.....	121
4.5.3	En infección por SSV8 + choque térmico.....	122
5	Discusión	125
5.1	Comportamiento de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 y expresión de las HSP ante escenarios de estrés térmico y viral por SSV8	125
5.2	Niveles de transcripción de los genes HSP α y HSP β en estrés viral por SSV8 en <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	128

5.3 Potenciales causas de la alta regulación de HSP en <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 por infección viral causada por SSV8.....	129
6 Conclusiones	135
6.1 Futuras investigaciones	137
7 Bibliografía	138

Lista de tablas

Tabla 1. Genomas de <i>Fusellovirus</i>	49
Tabla 2. Tratamiento de choque térmico..	64
Tabla 3. Tratamientos de infección de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 por SSV8..	665
Tabla 4. Diluciones para la curva patrón de proteína con BSA.....	68
Tabla 5. Cantidades para preparación de gel separador en SDP-PAGE.....	69
Tabla 6. Cantidades para preparación de gel concentrador en SDS-PAGE..	69
Tabla 7. Cantidades usadas para las soluciones tampón de las muestras para SDS-PAGE.	69
Tabla 8. Cantidades usadas para la preparación de la solución del contenedor externo para electroforesis.....	70
Tabla 9. Cantidades de reactivos usados para la preparación de la solución azul de Coomassie para la tinción de los geles.....	70
Tabla 10. Cantidades usadas para la preparación de la solución decolorante de geles post-electroforesis.....	70
Tabla 11. Cebadores utilizados en los experimentos de qPCR.....	81
Tabla 12. Concentraciones de proteínas totales.....	88
Tabla 13. Concentración proteínas de choque térmico.....	89
Tabla 14. Nivel relativo de HSP en gel.....	94
Tabla 15. Titulación de SSV8 por conteo de halos.....	98
Tabla 16. Concentraciones de proteínas totales.....	106
Tabla 17. Concentración de proteínas de choque térmico..	108
Tabla 18. Nivel relativo de HSP en gel.....	112

Lista de figuras

Figura 1. Función celular de las proteínas de choque térmico.....	18
Figura 2. Representación celular de la respuesta al choque térmico en Archaea.....	21
Figura 3. Evolución de las chaperoninas.....	25
Figura 4. Esquema de las chaperoninas tipo HSP60 en <i>Sulfolobus</i>	27
Figura 5. Árbol filogenético de la vida.....	34
Figura 6. Ambientes extremos en la Tierra y extrapolación a otros ambientes planetarios.....	35
Figura 7. Filogenia actualizada de Archaea.....	37
Figura 8. Árbol filogenético del género <i>Sulfolobus</i>	39
Figura 9. Célula de <i>Sulfolobus solfataricus</i>	40
Figura 10. Ciclo celular de <i>Sulfolobus solfataricus</i>	41
Figura 11. Morfotipos de virus en Archaea.....	45
Figura 12. Micrografía de <i>Sulfolobus Spindle-shaped Virions</i>	47
Figura 13. Representación de la interacción virus-célula.....	50
Figura 14. Micrografías de infección por SSV en <i>Sulfolobus</i>	51
Figura 15. Cultivo semilla de S437.....	57
Figura 16. Cultivos de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 infectados con SSV8.....	65
Figura 17. Sedimentos de proteínas.....	71
Figura 18. Patrón de corrimiento de proteínas en gel para SDS-PAGE.....	72
Figura 19. Resuspensión del sedimento de células de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2.....	74
Figura 20. Visualización del RNA.....	75
Figura 21. Gen Thermosoma alpha (thsA).....	77
Figura 22. Gen Thermosoma beta (thsB).....	78
Figura 23. Regiones de dirección de los cebadores.....	79
Figura 24. Cebadores para gen vpl-SSV8.....	79
Figura 25. Curva de crecimiento de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 en choque térmico a 80 °C.....	83
Figura 26. Curva de crecimiento de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 en choque térmico a 85 °C.....	84
Figura 27. Curva de crecimiento de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 en choque térmico a 90 °C.....	86
Figura 28. Concentración proteica por ensayo de Bradford para choque térmico.....	90
Figura 29. SDS-PAGE para choque térmico de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2.....	93

Figura 30. Análisis densimétrico del gel SDS-PAGE de choque térmico para <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2.	95
Figura 31. Titulación de virus por formación de halos.....	97
Figura 32. Cuantificación viral por formación de halos en infección a <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 por SSV8.....	98
Figura 33. Curva de crecimiento de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 infectado con SSV8.....	100
Figura 34. Curva de crecimiento de réplicas <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 infectado con SSV8..	103
Figura 35. Curva de crecimiento promedio total de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 infectado con SSV8..	104
Figura 36. Niveles de concentración proteica total en células de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 infectadas con SSV8.	107
Figura 37. Niveles de concentración de proteínas termoestables en células de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 infectadas con SSV8.....	109
Figura 38. SDS-PAGE para infección de <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 por SSV8.....	111
Figura 39. Análisis densimétrico para gel SDS-PAGE de infección viral por SSV8 para <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2..	112
Figura 40. Porcentaje de inhibición 24-96 HPI.	114
Figura 41. PCR en muestras de RNA después del tratamiento con DNasa.....	115
Figura 42. PCR para generación de los estándares.....	116
Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR de estándares y muestras.....	117
Figura 44. Análisis de la curva de fusión en cebadores y ensayos de qPCR de nuevo diseño...	118
Figura 45. Curva estándar generada para los ensayos de qPCR alfa HSP α y HSP β	118
Figura 46. Cuantificación relativa de las transcripciones del gen HSP α y HSP β en <i>Sulfolobus solfataricus</i> p2 en choque térmico.....	120
Figura 47. Cuantificación relativa de las transcripciones del gen de HSP α y HSP β en <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 infectados con SSV8.....	122
Figura 48. Cuantificación relativa de las transcripciones del gen HSP α y HSP β en <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 infectado con SSV8 y en condición de choque térmico..	124
Figura 49. Representación de la respuesta sugerida de las HSP en la célula de <i>Sulfolobus</i> ante el estrés por infección viral con SSV8.....	130

Figura 50. Representación de la respuesta sugerida de las HSP en la célula de *Sulfolobus* ante estrés por choque térmico a células infectadas con SSV8. 132

Resumen

Las proteínas de choque térmico (HSP) están presentes en organismos de Archaea, Bacteria y Eukarya y están altamente reguladas como respuesta al estrés por aumento en la temperatura. Además, son responsables del plegamiento de proteínas sintetizadas y replegamiento de proteínas mal plegadas o desnaturalizadas teniendo así una función reguladora del equilibrio proteico en la célula. En el dominio Archaea estas chaperoninas se denominan grupo Archaeal II y se encuentran entre las proteínas expresadas con mayor abundancia en los sulfobales.

Los complejos de HSP son estructuras octadecámeros de doble anillo no américo compuestas por uno o más subunidades: HSP α , HSP β y HSP γ . En condiciones de estrés por choque térmico, HSP α y HSP β son las principales subunidades implicadas en la formación y función del complejo.

En esta investigación se estudiaron las consecuencias del estrés por infección viral en organismos del género *Sulfolobus*, tomando como modelo hospedero a *Sulfolobus Solfataricus* P2 y el agente viral a *Sulfolobus Spindle-Shape Virus 8* SSV8 (a.k.a SSVRH), buscando determinar si la expresión de HSP está regulada por la infección por SSV. Usando métodos en rt-qPCR, electroforesis en gel y cuantificación de proteínas (ensayo de Bradford). Los datos indican que bajo una temperatura de crecimiento óptima fisiológica de 76 ° C, la expresión tanto de HSP α como de HSP β fue similar; sin embargo, en condiciones de choque térmico (85 ° C durante 30 min), se observó expresión de HSP β a concentraciones más altas que HSP α y el control fisiológico HSP β (76 ° C). A 76 ° C y 24 horas después de la infección (HPI) con SSV8, se observó que ambas subunidades de HSP estaban en una concentración intracelular más baja que los controles no infectados.

Después de 48 HPI con SSV8 a 76 ° C, la expresión de ambos subtipos de HSP fue equivalente a los controles no infectados a la misma temperatura fisiológica. Teniendo en cuenta que hay menos células vivas en un momento determinado después de la infección (frente a los controles no infectados), la concentración de HSP equivalente sugiere que hay una regulación positiva de la expresión de HSP durante la infección a 76 ° C, destacando una ratio alta de los genes de HSP β sobre HSP α .

En base a estos resultados reportados por primera vez, está claro que la cepa de *Sulfolobus solfataricus* P2 responde a la infección por SSV8 regulando al alza la expresión de HSP tanto en condiciones fisiológicas como de choque térmico.

En general, estos datos sugieren que las chaperoninas del grupo II y los complejos HSP desempeñan un papel en la dinámica de la infección del huésped SSV. La caída repentina en la expresión de HSP al principio de la dinámica de la infección sugiere que los recursos metabólicos del huésped se han redirigido; sin embargo, más adelante en el ciclo de la infección, la expresión de HSP celular se recupera.

Queda por examinar si los complejos de HSP protegen las proteínas nativas durante la infección por SSV o ayudan en el plegamiento de las proteínas virales. Por lo anterior, se puede también sugerir que el incremento de HSP ante la infección por SSV es la respuesta al aumento de proteínas virales en el citoplasma de *Sulfolobus* las cuales podrían llegar a ser identificadas como un posible exceso proteico de la célula activando así la función proteico-reguladora de las HSP para mantener el equilibrio de proteínas del hospedador, aunque esto debe ser objeto de investigaciones subsecuentes.

Summary

Heat shock proteins (HSPs) are present in Archaea, Bacteria and Eukarya organisms and are highly regulated in response to stress due to temperature increase. In addition, they are responsible for the folding of synthesized proteins and refolding of misfolded or denatured proteins thus having a regulatory function of protein balance in the cell. In the Archaea domain these chaperonins are called Archaeal group II and are among the most abundant expressed proteins in *Sulfolobales*.

HSP complexes are non-ameris double stranded octadecameric structures composed of one or more subunits: HSP α , HSP β and HSP γ . Under heat shock stress conditions, HSP α and HSP β are the main subunits involved in complex formation and function.

In this research we studied the consequences of stress by viral infection in organisms of the genus *Sulfolobus*, taking *Sulfolobus Solfataricus* strain P2 as host model and *Sulfolobus Spindle-Shape Virus 8* SSV8 (a.k.a SSVRH) as the viral agent, seeking to determine whether HSP expression is regulated by SSV infection. Using methods in rt-qPCR, gel electrophoresis and protein quantification (Bradford assay). The data indicate that under physiological optimal growth temperature of 76 °C, expression of both HSP α and HSP β was similar; however, under heat shock conditions (85 °C for 30 min), HSP β expression was observed at higher concentrations than HSP α and physiological control HSP β (76 °C). At 76 °C and 24 h post infection (HPI) with SSV8, both HSP subunits were observed to be at a lower intracellular concentration than uninfected controls.

After 48 HPI with SSV8 at 76 °C, the expression of both HSP subtypes was equivalent to uninfected controls at the same physiological temperature. Considering that there are fewer live cells at a certain time after infection (vs. uninfected controls), the equivalent HSP concentration suggests that there is a positive regulation of HSP expression during infection at 76 °C, emphasizing a high ratio of HSP β over HSP α genes.

Based on these first reported results, *Sulfolobus solfataricus* strain P2 responds to SSV8 infection by up-regulating HSP expression under both physiological and heat shock conditions.

Overall, these data suggest that group II chaperonins and HSP complexes have a role in the dynamics of host SSV infection. The sudden drop in HSP expression at the beginning of

infection dynamics suggests that host metabolic resources have been redirected; however, further along in the infection cycle, cellular HSP expression recovers.

It remains to be examined whether HSP complexes protect native proteins during SSV infection or assist in the folding of viral proteins. Therefore, it can also be suggested that the increase in HSPs after SSV infection is the response to the increase of viral proteins in the *Sulfolobus* cytoplasm, which could be identified as a possible excess of cell proteins, thus activating the protein regulatory function of HSPs to maintain the protein balance of the host, although this should be the subject of further investigations.

Introducción

1 Producción de proteínas de choque térmico (HSP) como respuesta al estrés

Cuando la mayoría de los organismos vivos conocidos en la Tierra: bacterias, hongos, plantas, y animales, se exponen a temperaturas superiores por encima de sus límites de soporte no letal, se aumenta la síntesis de proteínas específicas como una respuesta a ese cambio. Estas moléculas son conocidas como proteínas de choque térmico (HSP, del inglés *Heat Shock Protein*) y son responsables del plegamiento adecuado de los polipéptidos recién sintetizados y el replegamiento de los polipéptidos que se dañaron o se plegaron incorrectamente, debido a la desnaturalización proteica como se constata en la Figura 1 (Borges y Ramos, 2005; Horwich y Fenton, 2020; Lindquist y Craig, 1988; Parsell, 1993).

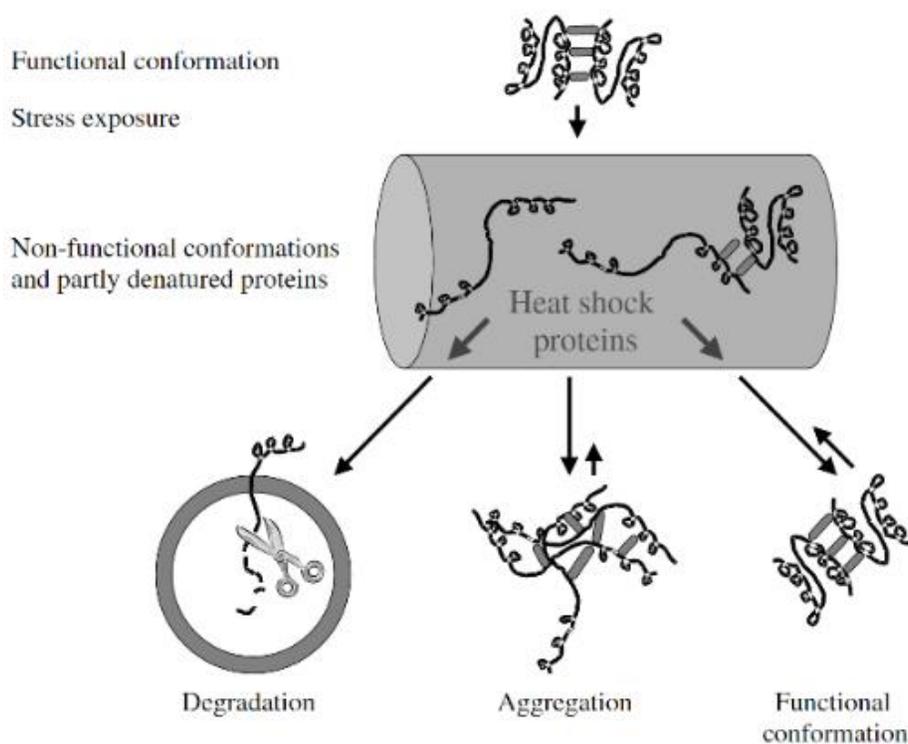


Figura 1. Función celular de las proteínas de choque térmico. Las HSP tienen como objetivo el plegamiento adecuado de los polipéptidos recién sintetizados y el replegamiento de los polipéptidos que se dañaron o se plegaron incorrectamente durante el cambio de equilibrio proteico. Las proteínas de conformación funcional, después de ser expuestas al estrés, buscan recuperar su conformación inicial, formar agregaciones o degradarse. *Nota. Adaptado de "The evolutionary and ecological role of heat shock proteins" (p. 1028), por J. Sørensen et al., 2003, Ecology Letters, 6(11).*

El término HSP se originó tras el descubrimiento, en 1962, de ciertos genes que codifican un grupo de proteínas con un peso molecular de 70 kDa, que se sobreexpresan en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, como respuesta a los aumentos de la temperatura ambiental (Hightower, 1991). Según Tissières et al. (1974), este concepto se introdujo años más tarde y se ha convertido en el término general para definirlos. Además de ser inducidas por el cambio de temperatura, la expresión de las HSP se puede producir por diferentes tipos de estrés como, por ejemplo, privación de nutrientes, radiación, hipoxia, metales pesados, estrés oxidativo, infecciones o exposición a citoquinas inflamatorias; por esta razón, también se denominan proteínas del estrés (Mansilla et al., 2012).

El estrés se entiende como una condición de tensión y llega a producir una disminución en la tasa de crecimiento o en la supervivencia del organismo (Booth, 2002). Las respuestas al estrés son de gran importancia para los microorganismos, en tanto que sus hábitats están sujetos a cambios continuos, como es el caso de los ambientes extremos, donde los parámetros ambientales tales como la temperatura, presión osmótica, radiación y la disponibilidad de sustratos son muy variables. Los factores que generan el estrés pueden tener una naturaleza ambiental, química o biológica, incluso el propio organismo puede ser para sí mismo la fuente de factores de estrés (Vorob'eva, 2003).

La mayoría de las HSP se sintetizan a bajas concentraciones en ausencia de estrés, pero se induce rápidamente si aumenta la temperatura o aparece otro factor estresante. Las HSP están divididas en familias de acuerdo con su peso molecular, así: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y pequeñas HSP (Large et al., 2009; Liang y MacRae, 1997; Saibil, 2013; Santoro, 2000). Estas reacciones al estrés térmico no son ajenas en las arqueas y son altamente similares a las observadas en los eucariotas superiores y están altamente conservadas (Vorob'eva, 2003).

Las HSP de las arqueas son estructural y funcionalmente similares a las chaperoninas bacterianas, a pesar de las diferencias considerables en sus secuencias de aminoácidos (Kagawa et al., 1995; Trent et al., 2003). De hecho, las HSP de arqueas son homólogas a la proteína eucariota conocida como TCP1s (Feder y Hofmann, 1999). En *Sulfolobus solfataricus*, las HSP60 ejercen interacción con el rRNA 16S mediante el RNA en vivo (Ruggero et al., 1998). Estas chaperoninas son estructuras de doble anillo que se encuentran en casi todos los

organismos y están compuestas por subunidades de proteínas de 60 kDa, denominadas HSP60 (Kagawa et al., 1995; Quaito-Randall et al., 1995; Trent et al., 1991).

Temperaturas superiores a las de su soporte de crecimiento y otros factores estresantes hacen que algunos organismos aumenten la síntesis de sus HSP60, y se ha sugerido que las chaperoninas desempeñan funciones esenciales para ayudar a las células a recuperarse del daño relacionado con el estrés (Trent et al., 1998). Puesto que las proteínas son dañadas por las tensiones inductoras de HSP60, se propuso un papel para las chaperoninas en el replegamiento de las proteínas dañadas (Hightower, 1991).

Prácticamente, todas las fuentes de estrés no térmicos pueden inducir HSP (Feder y Hofmann, 1999). Como se mencionó, los niveles de expresión y regulación de las HSP están seriamente descritos y estudiados en el estrés térmico; por ello, en esta propuesta de investigación se propone evaluar su comportamiento de regulación en presencia de otros factores estresantes como la infección viral.

El estrés térmico no letal y repentino genera en la célula una respuesta que garantiza la supervivencia, esto es, la HSR (Lemmens et al., 2018), la cual está ampliamente descrita en Bacteria y Eukarya. En Archaea se ha empezado a establecer que las HSP son componentes determinantes en la homeostasis de las proteínas a través del termosoma, donde las subunidades que le conforman se modifican en respuesta al estrés por choque térmico (Baes et al., 2020; Lemmens et al., 2018).

La acción de las HSP y su respuesta tienen una regulación de expresión génica mediada por un factor de transcripción de choque térmico (HSF, del inglés *Heat Shock Factor*) que se activa de modo que puede unirse a las secuencias reguladoras altamente conservadas en la región promotora de los genes inducibles por estrés (HSE, del inglés *Heat Shock Elements*) (Arya et al., 2007). Sin embargo, el aumento de la expresión de HSP no es totalmente beneficioso para el organismo, dado que, al ser muy alto, llega a consumir mucho sustrato biosintético, lo que conlleva a una saturación en el aparato de expresión de proteínas. Lo anterior, trayendo como consecuencia que no quede lo suficiente para otras biosíntesis importantes en el organismo (Sørensen et al., 2003).

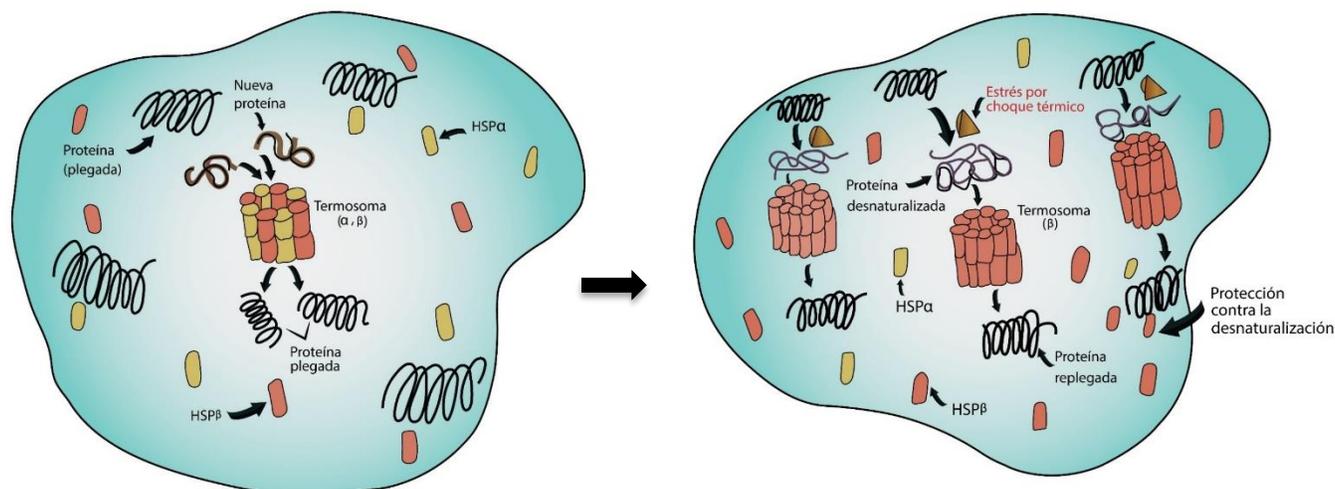


Figura 2. Representación celular de la respuesta al choque térmico en Archaea. En la gráfica 2 se observa que, en ausencia de estrés, la célula de *Sulfolobus* presenta niveles estables de proteínas de choque térmico que cumplen sus funciones básicas en el plegamiento de nuevas proteínas y acompañamiento de las células plegadas, y según el caso puede “secuestrar” las subunidades que están libres en el ambiente citoplasmático para generar nuevos complejos (termosoma) compuestos de las subunidades HSPα y HSPβ. En la gráfica 49B ante el estrés térmico la célula sobre expresa más HSP para contrarrestar la desnaturalización proteica y proteger a las demás proteínas del daño por alta temperatura. Predomina HSPβ en los complejos. *Nota. Adaptado “Heat shock response in Archaea” (p. 583), por de L. Lemmens et al., 2018, Emerging Topics in Life Sciences, 2(4).*

Como se explicó anteriormente, los genes de choque térmico se han conservado en gran medida durante la evolución, no solo en sus secuencias codificantes de proteínas en humanos, sino también en sus secuencias reguladora; lo que indica que los procesos de ajuste y estabilidad frente a cambios extremos en el ambiente están presentes en los organismos (Hunt y Morimoto, 1985; Schlesinger, 1990). Además, por ahora se sabe que las respuestas de diferentes células y organismos están reguladas por diferentes vías, estableciendo de esta manera sus características biológicas específicas, y proporcionando una destacada demostración de variabilidad y adaptación biológica a las condiciones estresantes que puedan presentársele al organismo (Lindquist y Craig, 1988).

Bajo dicha perspectiva, se debe pensar en cómo se expresan y regulan las HSP en condiciones “normales” de estrés, y bajo qué factores estresantes se empezarían a sobreexpresar. Por ejemplo, tanto en bacterias como en organismos eucarióticos, el choque térmico induce la síntesis de HSP

principalmente a nivel de transcripción, lo que refleja un aumento de la demanda celular de HSP a una temperatura más alta (Yokota et al., 2000). La respuesta es muy rápida y transitoria, dado que la inducción máxima se alcanza en varios minutos y disminuye gradualmente hasta alcanzar un nuevo nivel de estado estable. Aunque el mecanismo de regulación es básicamente transcripcional, varias formas de regulación postranscripcional juegan un papel importante en el control estricto de la expresión de las HSP para hacer frente a los cambios bruscos de temperatura (Vierke et al., 2003).

Un paso final para establecer la naturaleza adaptativa de las HSP es demostrar que realmente satisfacen los criterios de origen y el mantenimiento a través de la selección natural; es decir, la variación interindividual y la heredabilidad del organismo. En muchos de estos casos, la variación interindividual se correlaciona con la tolerancia al estrés (Feder y Hofmann, 1999; Macario et al., 2006; Sørensen et al., 2003). Desde este punto de vista, se empieza a identificar la relevancia adaptativa de las HSP en condiciones naturales.

En este sentido, la demostración de que un organismo sufre estrés en la naturaleza se vuelve complicada, debido a que las condiciones en medio silvestre suelen ser muy distantes de lo que sucede en el laboratorio. Los organismos, en su medio natural, rara vez podrían encontrarse con tensiones únicas y controladas, y las diferentes fuentes de estrés o la suma de estas en diferentes momentos de su ciclo de vida pueden llegar a tener impactos inesperados que deben ser estudiados y evaluados.

Para uno de los casos de experimentación en esta propuesta se deberá tener en cuenta que las proteínas del estrés parecen tener un papel definido en los ciclos de vida de los parásitos (virus en este caso); es decir, que tanto el huésped como el parásito parecen experimentar “estrés” y cada uno responde de una manera característica que puede ser la base de las consecuencias patológicas de interacción evolutiva. En este caso, la evolución de la tolerancia implicaría la modulación de la respuesta al estrés tanto del huésped como del parásito (Feder y Hofmann, 1999). Incluso, los virus parecen ser capaces de responder al estrés al estar dentro de las células huésped (McFadden, 1998).

A partir de lo anterior es posible inferir que las HSP convencionales podrían no estar involucradas en todos estos casos de estrés, pero estos aspectos deberán ser examinados de

manera particular teniendo en cuenta las funciones y reacciones de estas subunidades proteicas dentro del citoplasma.

1.1 Funciones de las HSP en el plegamiento de proteínas

“Tanto *in vivo* como *in vitro*, la transición de una proteína desde su estado no plegado a su conformación nativa frecuentemente es el resultado de la interacción con una serie de proteínas denominadas chaperonas moleculares” (Cuéllar, 2008, p. 7). Este término se utilizó por primera vez para describir la función de la nucleoplasmina, una proteína ácida nuclear presente en el ensamblaje de nucleosomas de DNA e histonas en extractos de huevos de *Xenopus* (Laskey et al., 1978).

Durante el proceso de plegamiento de proteínas *in vivo*, las chaperonas previenen la agregación de conformaciones no nativas y mantienen a las proteínas con las condiciones necesarias para su plegamiento correcto. Por otro lado, varias chaperonas pueden mantener también a proteínas recién sintetizadas en una conformación no nativa para facilitar su transporte a través de la membrana celular, así como unirse a proteínas no nativas durante el estrés celular.

Este proceso de asistencia tiene lugar en la mayoría de las proteínas, ya que estas interactúan con alguna chaperona en alguna etapa de su plegamiento. Así, la importancia de las chaperonas moleculares se fundamenta en la necesidad de prevenir la agregación durante el plegamiento de cadenas polipeptídicas recién sintetizadas, prevenir interacciones no deseadas con otros componentes celulares, dirigir el ensamblaje de proteínas de gran tamaño y complejos multiproteicos y, durante situaciones de estrés, potenciar el plegamiento de numerosas proteínas. (Cuéllar, 2008, p. 8)

Dentro del citoplasma, las chaperonas se unen a las superficies hidrofóbicas de las proteínas, facilitando el plegamiento y previenen la agregación irreversible de proteínas (Walter y Buchner, 2002; Willison y Horwich, 1996). Cabe mencionar que las chaperonas son necesarias para el proceso de degradación de proteína, pues cuando las proteínas sufren un plegado incorrecto, llevan a cabo el proceso de ubiquitinación que conduce a la destrucción de la proteína (Bakthisaran et al., 2015; Parsell, 1993; Sørensen et al., 2003).

Las chaperoninas HSP60 son complejos de proteínas que están presentes en todos los organismos. Su objetivo principal es asistir, facilitar y supervisar el plegamiento y replegamiento de proteínas recién sintetizadas en el citoplasma de la célula. Además, son esenciales para el crecimiento y supervivencia de las células a todas las temperaturas y en condiciones de estrés térmico, y asisten en el plegamiento de proteínas (Borges y Ramos, 2005; Bross, 2015; Horwich y Fenton, 2020; Kagawa et al., 1995; Trent et al., 2003)

Aunque toda la información que precisa una proteína para plegarse reside en su propia secuencia, el interior de la célula está con un nivel alto de proteínas que presentan problemas de agregación, pues los intermediarios del plegamiento pueden tener expuestas regiones hidrófobas (Chaston et al., 2016; Hayer-Hartl et al., 2016; Huo et al., 2010).

Como se indicó anteriormente, para evitar los problemas que surgen como consecuencia de un estrés térmico, la célula expresa proteínas auxiliares chaperonas que secuestran temporalmente las conformaciones no plegadas, o desnaturalizan las mal plegadas y les dan otra oportunidad de plegarse correctamente (chaperoninas) sin ser parte final de la proteína producto (Iizuka et al., 2008; Sterner y Liebl, 2001).

1.2 Rol evolutivo de las proteínas de choque térmicos HSP: Chaperoninas del grupo I y II

La evolución de las chaperoninas establece una serie de ramas especializadas para cada dominio (Figura 3) y la secuencia de comparaciones de aminoácidos de las subunidades de chaperoninas. Asimismo, los análisis estructurales de los anillos dobles permiten identificar dos grupos de chaperoninas: I y II.

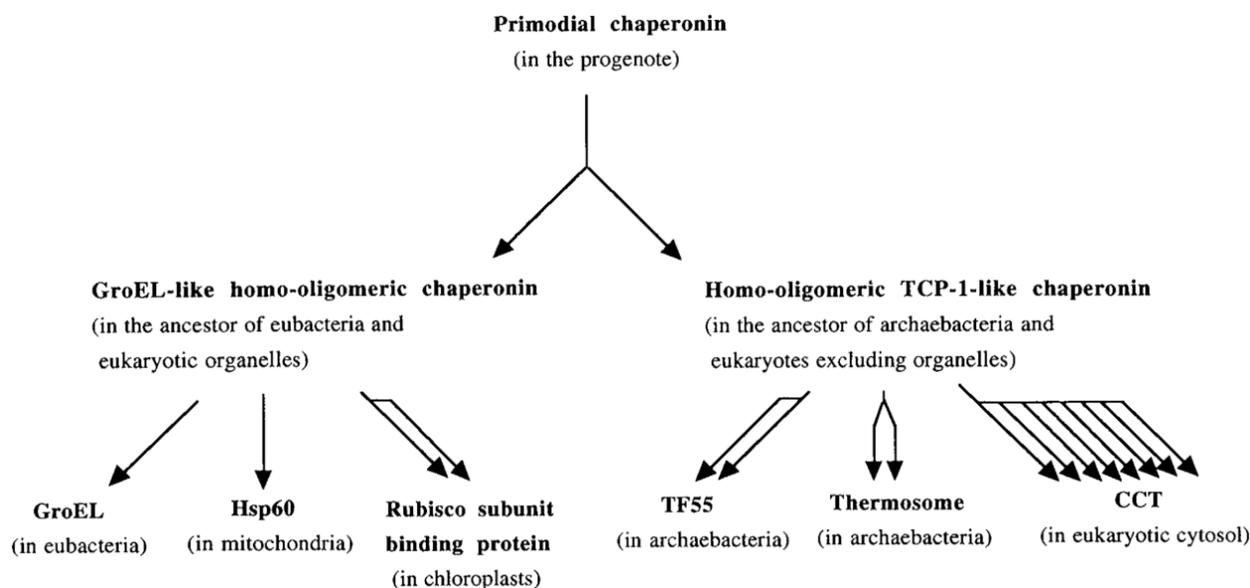


Figura 3. Evolución de las chaperoninas. Diagrama construido por homología en secuencias homólogas de aminoácidos entre subunidades, teniendo como referencia la teoría endosimbiótica. Una flecha indica especies de subunidades. *Nota.* Adaptado de “Structure and Function of Chaperonins in Archaeobacteria and Eukaryotic Cytosol” (p. 108), por K. Willison y A. Horwich, 1996, *The Chaperonins*.

En Archaea se denominan TF55 y TF56. El grupo I está en bacterias, Eukarya (cloroplastos y mitocondrias), y su composición es cercana con siete subunidades cada una dispuesta en dos anillos (Willison y Horwich, 1996). El grupo II, que se encuentra en Archaea y Eukarya, está en una estructura de anillo doble compuesta de 60 +/- kDa idénticas, con ocho o nueve subunidades (Macario et al., 2006; Macario et al., 1999; Trent et al., 2003; Yaoi et al., 2004).

Las chaperoninas se han estudiado en detalle en tres especies de arqueas termófilas: *Sulfolobus shibatae* (Kagawa et al., 1995; Trent et al., 2002; Trent et al., 1991; Yaoi et al., 2004), *Sulfolobus solfataricus* (Ellis et al., 1998; Knapp et al., 1994; Marco et al., 1994), y *Pyrodictium occultum* (Waldmann et al., 1995).

1.2.1 Las chaperoninas del grupo I

Las chaperoninas denominadas tipo I están presentes en eubacterias y en la matriz de mitocondria y cloroplastos de organismos eucarióticos. Están conformadas de una proteína de 60 kDa con 14 copias distribuidas dentro de una estructura simétrica similar a un cilindro de 72

puntos, el cual se encuentra constituido por uno o dos anillos heptaméricos (Figura 14) (Bigotti y Clarke, 2008; Bukau y Horwich, 1998; Chaston et al., 2016).

La proteína más estudiada dentro de esta familia es GroEL de *Escherichia coli* (Kumar et al., 2015). GroEL es una proteína esencial para la viabilidad de la bacteria y se ha demostrado que al menos el 10 % de las proteínas celulares interaccionan con esta chaperonina (Hayer-Hartl et al., 2016; Horwich y Fenton, 2020). Sin embargo, durante varios años se estudió la interacción de GroEL con el mecanismo de morfogénesis viral y no su función propia en la bacteria, y cuando se descubrió su homología con otras proteínas de similar peso molecular e involucradas, además, en mecanismos de defensa relacionados con el choque térmico, GroEL comenzó a ser utilizada para caracterizar los mecanismos de asistencia en el plegamiento de proteínas (Hayer-Hartl et al., 2016; Lin y Rye, 2006).

1.2.2 Chaperoninas del grupo II

Las chaperoninas tipo II se encuentran en Archaea y en el citosol eucariótico relacionado con la evolución, conocido como complejo de anillo proteico del complejo T (TRiC o CCT), chaperoninas que contienen TCP-1 (Bigotti y Clarke, 2008; J. Ellis, 1997; Gutsche et al., 1999; López et al., 2015; Quait-Randall et al., 1995; Waldmann et al., 1995) y dentro de sus funciones asiste específicamente al plegamiento de actinas y tubulinas, dos proteínas citoesqueléticas de vital importancia para la célula e hipotéticamente las chaperoninas son propuestas en Archaea como una potencial estructura con funciones de citoesqueleto (Ellis, 1997; Liang y MacRae, 1997; Trent et al., 2002; Yaoi et al., 1998).

Algunas chaperoninas de las arqueas se construyen a partir de un solo tipo de subunidad de 60 kDa, pero la mayoría consta de dos subunidades HSP α y HSP β (Bigotti y Clarke, 2008; Ditzel et al., 1998; Taguchi et al., 1996; Yaoi et al., 2004). En el caso de *Sulfolobus*, este codifica tres subunidades TF55 α , β , γ , que forman una serie de diferentes complejos (Chaston et al., 2016; Knapp et al., 1994; Liang y MacRae, 1997; Yaoi et al., 2004).

Estas subunidades están dispuestas alternativamente en un complejo hexadecamérico de dos anillos de ocho miembros y guardan una estrecha relación con las ocho subunidades eucarióticas CCT, que también están dispuestas en pares de anillos de ocho miembros (Figura 4) (Bigotti y Clarke, 2008; Chaston et al., 2016; Ditzel et al., 1998; Knapp et al., 1994; Lemmens et al., 2018).

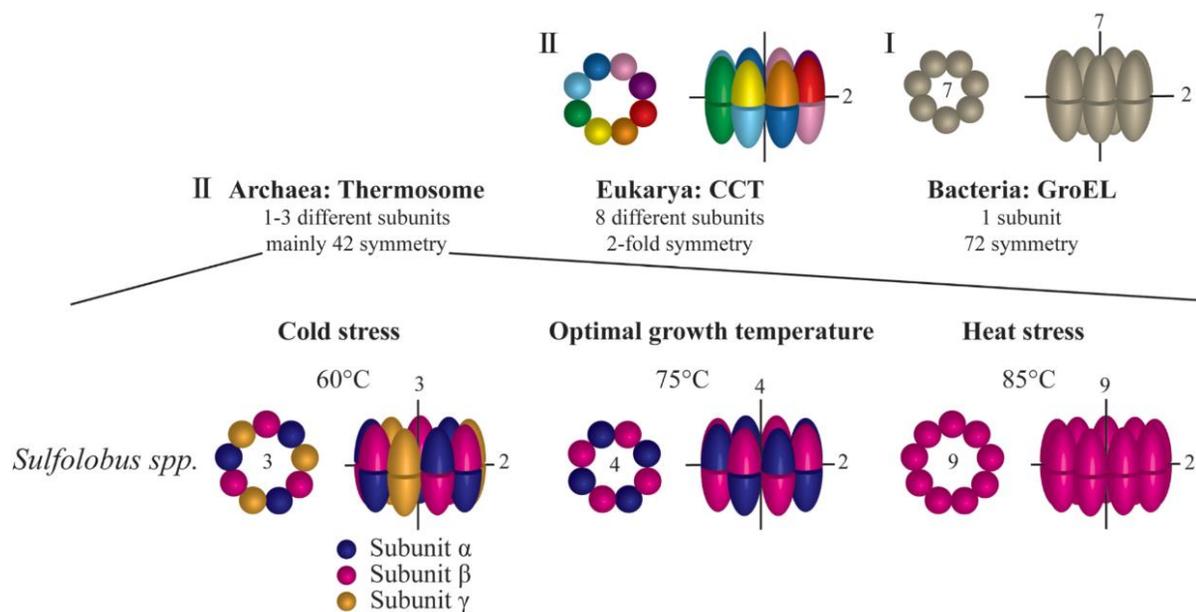


Figura 4. Esquema de las chaperoninas tipo HSP60 en *Sulfolobus*. Las chaperoninas eucariotas del grupo II, CCT, y cuenta con dos anillos de ocho miembros con ocho subunidades parálogas por anillo. La chaperonina, GroEL del grupo bacteriano I, tiene 14 copias de la misma subunidad de 60 kDa distribuidas en dos anillos de siete miembros. Las chaperoninas del grupo de Archaea II generalmente constan de dos anillos de ocho miembros, dispuestos con subunidades HSP α y HSP β alternas. En *Sulfolobus* están presentes HSP α , HSP β y HSP γ parálogas, distribuidas en diferentes conformaciones según el choque térmico. *Nota.* Adaptado “Heat shock response in Archaea” (p. 583), por de L. Lemmens et al., 2018, *Emerging Topics in Life Sciences*, 2(4).

Los estudios estructurales realizados con CCT y HSP60 muestran que estas poseen los mismos dominios (ecuatorial, intermedio y apical) que GroEL, así como sus dos mismas conformaciones básicas (Gutsche et al., 1999; Lin y Rye, 2006; Skjærven et al., 2015; Vallin y Grantham, 2019).

Se ha caracterizado una conformación abierta, que se produce en ausencia de ATP (Guagliardi et al., 1997), y en la que la cavidad se ofrece accesible para la interacción con el sustrato, a diferencia de otras chaperonas que unen segmentos de la cadena polipeptídica. Las chaperoninas pueden interactuar con la totalidad de la secuencia polipeptídica, gracias a su estructura hueca y oligomérica (Knapp et al., 1994; Yaoi et al., 2004).

Este complejo proteico conformado por HSP α , HSP β y HSP γ también se ha denominado factor termófilico 55 (TF55) y es referenciado como rosetasoma, termosoma y, en Archaea, Archeosoma (Archibald, 1999; Gómez-Puertas et al., 2004; Kagawa et al., 1995; Klunker et al., 2003; Mitsuzawa et al., 2009; Yaoi et al., 2004). Fue detectado como la única proteína

sintetizada en condiciones de choque térmico en arqueas termófilas (Trent et al., 1990), a diferencia de la mayoría de otras arqueas, que codifican dos subunidades (HSP α , HSP β) de chaperonina tipo II (Horwich et al., 2007).

Procesos de purificación *in vitro* de TF55 en especies de *Sulfolobus* y *Pyrodictium occultum* han exhibido actividad ATPasa (Knapp et al., 1994; Trent et al., 1991), revelando una unión selectiva a proteínas mesófilas a temperaturas altas (Trent et al., 1991). De lo anterior se infiere que la mayoría de estas proteínas probablemente funcionan como acompañantes moleculares en condiciones de no estrés en la célula (Saibil, 2013; Sørensen et al., 2003). También se ha demostrado la interacción de una serie de enzimas termofílicas con TF55 (Guagliardi et al., 1994; Ranawat y Rawat, 2017b; Saibil, 2013), extendiendo así sus funciones aún sin determinar.

Este complejo proteico TF55 se asemeja a la de GroEL (Eubacteria) en el citoplasma bacteriano (Kagawa et al., 1995; Knapp et al., 1994; Marco et al., 1994; Trent et al., 1991) y también presenta semejanzas en las propiedades bioquímicas de la actividad de la ATPasa, además de la capacidad de unirse las proteínas no nativas (Bigotti y Clarke, 2005; Furutani et al., 1998).

Dado que GroEL está involucrada en el plegado de al menos el 40 % de los recién traducidos proteínas solubles en *Escherichia coli* (Gómez-Puertas et al., 2004; Horwich y Fenton, 2020), es concebible que TF55, con su abundancia similar, cuente con un papel amplio en la mediación del plegamiento de muchas proteínas recién traducidas en arqueas termófilas (Archibald, 1999; Schoehn et al., 2000; Yaoi et al., 2004).

Después del descubrimiento de la subunidad HSP γ en el genoma de *Sulfolobus* (Archibald, 1999), se reveló que los niveles de expresión y las cantidades relativas de subunidades varían con la temperatura (Trent et al., 2003; Yaoi et al., 2004). Es así como la tercera subunidad HSP γ solo está presente en condiciones de choque frío (60 °C a 75 °C), mientras que HSP α y HSP β están presentes a temperaturas normales de crecimiento (75 °C a 79 °C), y en las situaciones de estrés por choque térmico (≥ 85 °C) predomina en alza la subunidad HSP β (Baes et al., 2020; Chaston et al., 2016; Nitsch et al., 1997; Yaoi et al., 2004).

De esa manera, se estableció que las tres subunidades en *Sulfolobus sp* tienen propiedades diferentes en lo que a términos de estabilidad térmica se refiere, así como su tendencia a formar complejos. En ese sentido, se encontró que, en condiciones de estrés por choque térmico,

predomina la combinación de subunidades HSP $\alpha\beta$ y en temperaturas bajas el complejo mixto HSP $\alpha\beta\gamma$. Hay que mencionar que la anterior distribución de subunidades está dada para un tipo de estrés en particular, el térmico, por lo que cabe cuestionar sobre qué reacciones y respuestas pueden generar las células sulfolobales ante otras condiciones que alteren su estabilidad fisiológica y metabólica.

1.3 Importancia evolutiva y factores estrés en *Sulfolobus*

Como ya se mencionó las proteínas de choque térmico son inducidas por estrés y están fuertemente involucradas en la resistencia a otros tipos de estrés en los organismos (Feder y Hofmann, 1999). Esto sugiere que el papel evolutivo del estrés como estrategia de supervivencia tiene alta relevancia aun en especies que habitan ambientes considerados en estrés permanente o extremos. Cuando los organismos están sometidos a factores estresantes, pueden llegar a presentar tres reacciones (Hoffmann y Parsons 1991):

- Para evitarlo, los miembros de una población pueden cambiar de hábitat ajustando su estado fisiológico o metabólico, representado en latencia o dormancia celular.
- Adaptarse a las condiciones que generan el estrés por un proceso de selección natural o por plasticidad fenotípica.
- Fracasas en las acciones anteriores, colapsar en su reproducción y extinguirse.

Teniendo en cuenta estas respuestas a las condiciones estresantes, estas se pueden considerar como fuerzas evolutivas a través de la adaptación. Los factores ambientales que causan estrés son extensos e inesperados en ambientes naturales y afectan la distribución y abundancia de especies en sus hábitats. Entre esos factores se incluyen: sustancias químicas entre los que están metales pesados, competencia, depredación o parasitismo, temperatura y humedad, acceso a nutrientes o recursos. El estrés genético incluye la endogamia y la fijación de genes deletéreos (Sørensen et al., 2003).

Los cambios ambientales derivados de la actividad antropogénica (contaminación, deforestación, cambios climáticos, fragmentación del hábitat) podrían ser más drásticos y generar más afecciones impredecibles en todos los seres vivos, como el incremento de la endogamia y la deriva genética (Sørensen et al., 2003).

En el caso de los organismos más antiguos de la Tierra los pertenecientes al dominio Archaea, las condiciones extremas de la tierra primitiva y los cambios sufridos en las diferentes eras a través de constantes y desconocidos factores de estrés son una alta muestra de adaptación y acomodación teniendo en cuenta su presencia actual en el árbol de la vida, estableciendo así su persistencia evolutiva.

1.3.1 Situaciones de estrés en Sulfolobales

Por lo general, los organismos pertenecientes al género *Sulfolobus* se describen como aeróbicos (Kawarabayasi et al., 2001). En 2009, la cepa *Sulfolobus solfataricus* P2 se cultivó aeróbicamente en presencia de diferentes concentraciones de O₂ (v/v, fase gaseosa), encontrando que tiene un crecimiento óptimo en el rango de 1,5 a 24 % de O₂, al 26-32 % de O₂. El crecimiento del cultivo tuvo afectación moderada frente al control de cultivo de 21 % y al 35 % la concentración fue letal, dado que no se presentó crecimiento. Este estudio permitió evidenciar una adaptación del sistema respiratorio de *Sulfolobus solfataricus* P2 en respuesta a concentraciones fluctuantes de oxígeno, regulado por una expresión diferencial de genes codificantes a oxidasas terminales (Simon et al., 2009).

Las arqueas presentan rangos de crecimiento desde 113 °C (Andra et al., 1998; Stetter, 2006) hasta menos de 0 °C (Cavicchioli et al., 2000; Groussin y Gouy, 2011; Haslbeck et al., 2005; Mega et al., 2010); pero incluso los miembros de la Crenarchaeota, considerados en su mayoría hipertermófilos, también pueden tener presencia en ambientes tan profundos y de baja temperatura como las bacterias (DeLong, 1998; Nelson-Sathi et al., 2015; Trent, 2000).

Los datos sobre la respuesta al choque de frío y la adaptación a bajas temperaturas se han centrado en la posible detención de la síntesis de proteínas, basados en observaciones que proponen que el ribosoma era el sensor térmico para el frío en bacterias (VanBogelen y Neidhardt, 1990). Es por esto por lo que la respuesta frente al estrés por frío actúa para revertir los efectos adversos sobre la síntesis de proteínas, además de un número limitado de procesos metabólicos fundamentales en un ambiente extremo (Cavicchioli et al., 2000; Santoro, 2000; Vorob'eva, 2003). Por lo anterior, se infiere que en Archaea se hayan desarrollado vías de adaptación a bajas temperaturas que no se encuentran en Bacteria o Eukarya (Cavicchioli et al., 2000).

La tolerancia al estrés por desecación se presenta a corto y largo plazo en Archaea y está relacionada con otras variables como la temperatura de almacenamiento, pH, y presencia o ausencia de oxígeno y de la especie (Beblo et al., 2009, 2011; Laksanalamai y Robb, 2004; Ranawat y Rawat, 2017a). Respuestas a la desecación se han encontrado en cepas metanogénicas y halófilas de Archaea (Kendrick y Kral, 2006; Leigh et al., 2011). Esta tolerancia a la desecación y a la radiación, en algunos casos, se compara con la de *Deinococcus radiodurans*, uno de los organismos más característicos por sus resistencia a estos factores de estrés (Beblo et al., 2011; Ranawat y Rawat, 2017a).

En el caso de *Sulfolobus*, su respuesta y tolerancia al estrés por desecación está direccionada por el pH y el sustrato del cultivo de la siembra del microorganismo en laboratorio. Además, existen serias diferencias en la tolerancia a la desecación entre organismos del mismo orden e incluso de cepas del mismo género estrechamente relacionadas. Los resultados muestran que la tolerancia de las células vegetativas a la desecación son un fenómeno común de microorganismos termófilos e hipertermófilos, independientemente de su hábitat de origen (Beblo et al., 2009, 2011).

Por lo anterior, es posible proponer que las especies termófilas e hipertermofílicas presentan una tolerancia significativa contra la desecación en compañía de condiciones de alto vacío y radiación UV monocromática (254 nm), así como una alta dosis de radiación gamma (hasta 10 kGy) para algunos de estos microorganismos, resultando ser organismos modelo para experimentos de interés en astrobiología, específicamente para condiciones espaciales simuladas y de exposición directa a variables en el espacio exterior (Beblo et al., 2009; Ranawat y Rawat, 2017a; Trent, 2000; Yeats et al., 1982).

Los estudios de interacciones de microorganismos con uranio (U) se han enfocados en bacterias, debido a que las paredes de las células bacterianas gramnegativas se unen al U en interacción de las capas de lipopolisacáridos de la membrana externa, ricas en fosfolípidos y péptidos cortos, ausentes en los sulfobales que, por el contrario, presentan una capa de superficie proteica anclada a la membrana (capa S) que está glicosilada (Reitz et al., 2010).

Para el caso de *Sulfolobus acidocaldarius*, enfrentando un estrés por presencia de uranio (VI), se ha demostrado, a través de espectroscopía de absorción de rayos X y de fluorescencia, que a un pH 2 esta cepa de Archaea posee una baja tolerancia a U (VI) y que su crecimiento se limita a

una concentración de U por debajo de 1,1 mM, a valores de pH de 1,5 y 3,0 que se encuentran en el rango del óptimo fisiológico de la cepa. Los resultados muestran una tolerancia bastante baja a U (VI) y una acumulación limitada de U; por lo anterior, se plantea que esta reacción de las células de *Sulfolobus* ante el estrés por U (VI) a ambos valores de pH se produce a través de grupos fosfato orgánicos (Reitz et al., 2010).

Las células de *Sulfolobus solfataricus* P2, cuando son expuestas a estrés por radiación gamma, muestran una respuesta proteómica específica, restringida a solo unas pocas proteínas. Sin embargo, esta reacción de resistencia es dependiente de las condiciones de cultivo, por lo tanto, la fisiología de la célula de *Sulfolobus sp* constituye parámetros críticos para la resistencia a la irradiación (Larmony et al., 2015; Ranawat y Rawat, 2017a).

Asimismo, se ha demostrado que la irradiación gamma a 500 Gy provoca roturas de doble hebra de DNA en *Sulfolobus solfataricus* P2, las cuales se restauran completamente dentro de las primeras 4 horas después de la irradiación a la que fue sometido; aunque en otras condiciones, como se mencionó anteriormente, esta reparación no se presenta o es incompleta. En este estudio se concluyó que la cantidad total de proteínas extraídas no cambia entre las células de *Sulfolobus* irradiadas o no irradiadas, y que la dinámica de la síntesis y degradación de proteínas se modifica después de la irradiación (Larmony et al., 2015).

En estudios de limitación de medios nutritivos a *Sulfolobus acidocaldarius*, se eliminaron las fuentes de carbono y nitrógeno orgánico durante un transcurso de 4 horas. La respuesta celular frente a este tipo de estrés evidenció que los niveles de transcripción de 1118 de 2223 genes codificadores de proteínas, y la abundancia de aproximadamente 500 proteínas que contienen funciones en casi todos los procesos celulares se vieron afectados por el agotamiento de nutrientes (Bischof et al., 2019). De esa manera fue posible constatar un cambio significativo del metabolismo con respecto a la degradación del carbono orgánico interno y extracelular unido y la degradación de proteínas; además, se observaron cambios en la composición de lípidos de la membrana para acceder a fuentes alternativas de energía y mantener la homeostasis del pH (Bischof et al., 2019; Gill et al., 2019; Ranawat y Rawat, 2017b).

1.4 Dominio Archaea: representante ancestral y actual de organismos extremos

Los seres vivos que habitan el planeta Tierra están organizados en tres dominios, a saber: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* (Lewalter y Müller, 2006). Tal como se ejemplifica en la Figura 5, cada una de las ramas biológicas que se derivan a partir de estos tres dominios están basadas en secuencias de genes de RNA ribosómico (Iwabe et al., 1989; Woese et al., 1990). De las arqueas se tienen reportes de restos fósiles de hace más de 3.500 millones de años (Jaakkola et al., 2016) y, por ello, estos organismos se han caracterizado en las investigaciones sobre origen de la vida y procesos evolutivos; sin embargo, el rol más protagonista de estos organismos radica en ser identificados como “extremófilos”, aunque no todos los extremófilos son miembros de las arqueas y no todas las arqueas son extremófilos (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Gracias a esas características mencionadas, las arqueas se han convertido en uno de los ejes principales de las investigaciones en astrobiología, como modelos en la búsqueda de vida en otros ambientes planetarios (Cady et al., 2014; Merino et al., 2019; Trent, 2000). Las variables más significativas como temperatura, pH, salinidad, presión, entre otras, son evaluadas según las condiciones del hábitat de los organismos; y, posteriormente, estas se extrapolan bajo las características ambientales encontradas hasta ahora en cada uno de los planetas y lunas análogos a esos ambientes terrestres (Figura 6).

Desde el enfoque filogenético y por medio del análisis de las subunidades pequeñas del RNA ribosómico (SSU rRNA) (Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006), el dominio Archaea se dividió en dos filos: Crenarqueota y Euriarqueota (Woese et al., 1990). El primero se encuentra formado exclusivamente por termófilos e hipertermófilos que oxidan o reducen el azufre para obtener energía; mientras que el segundo se encuentra integrado por metanógenos, halófilos extremos, termoacidófilos y algunos hipertermófilos.

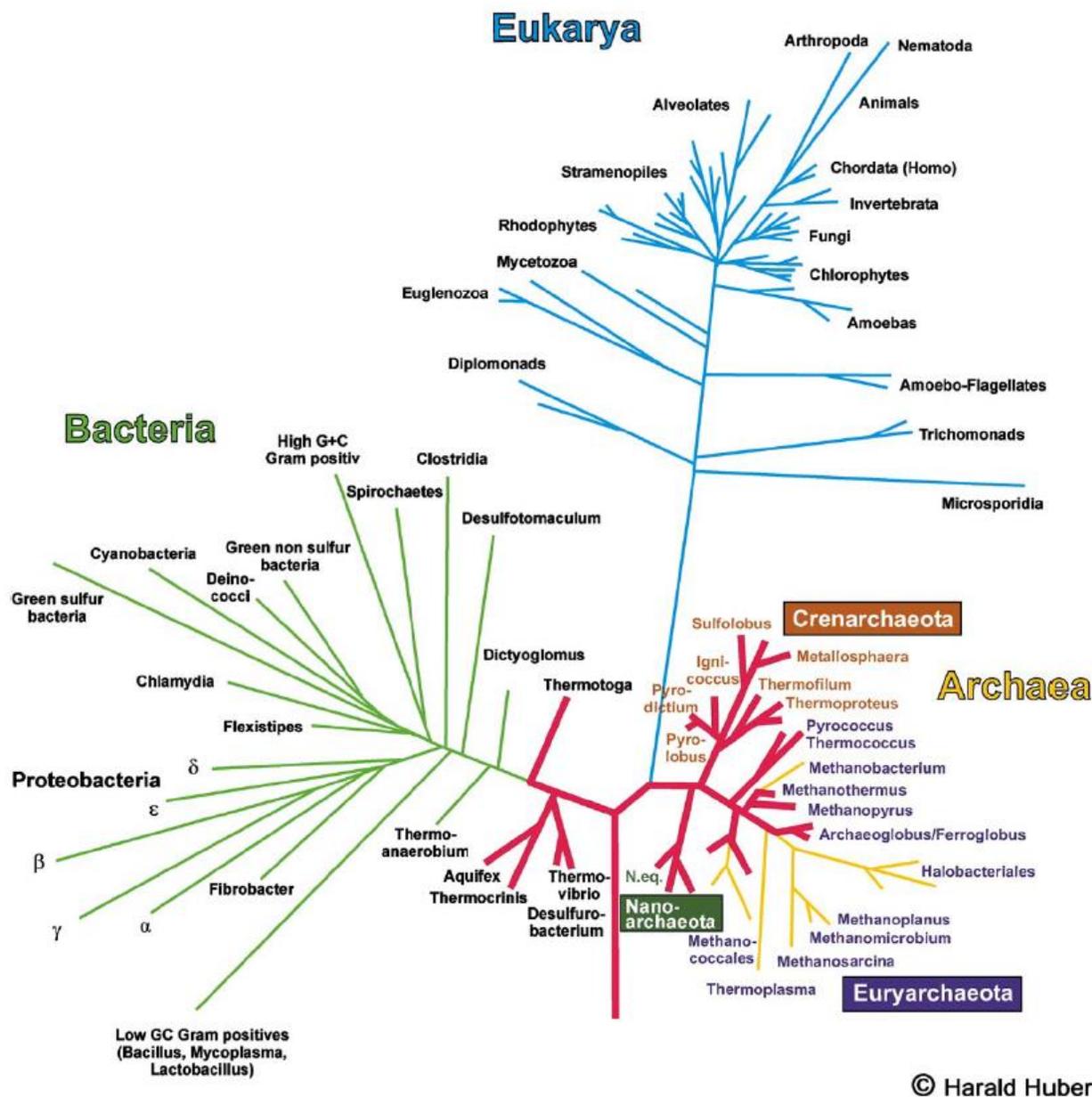
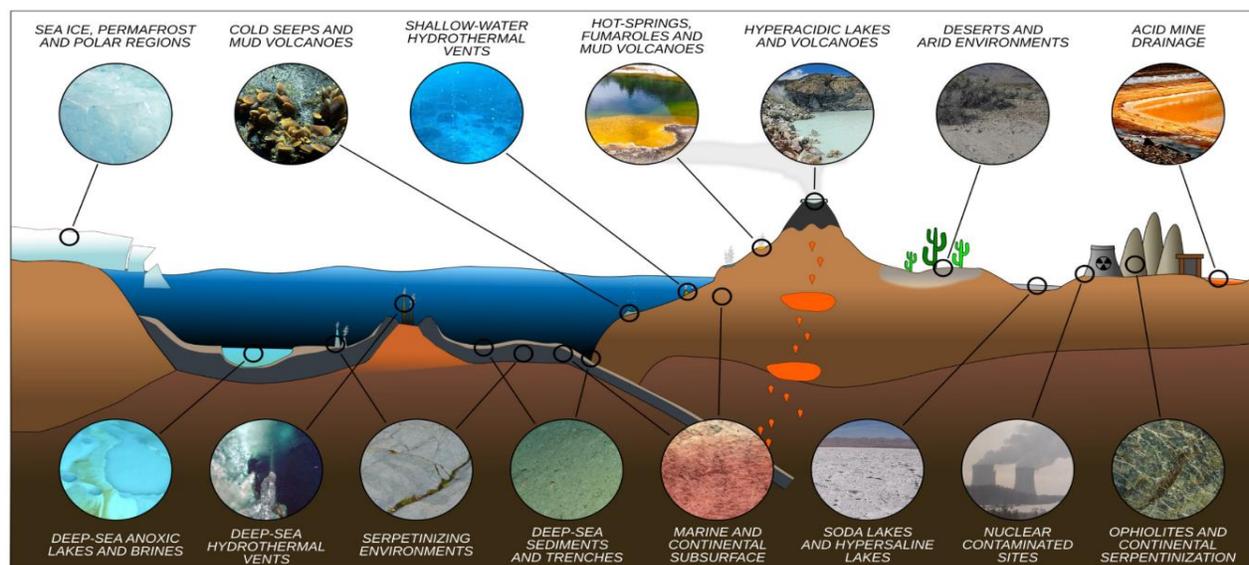


Figura 5. Árbol filogenético de la vida. Los tres dominios de organización biológica en la Tierra, basado en secuencias de 16S rDNA así como algunos representantes de cada grupo. Dentro de Archaea se destaca la línea roja que representa la línea evolutiva y su diversificación de los organismos hipertermófilos. *Nota.* Adaptado de “Bioenergetics of archaea: ancient energy conserving mechanisms developed in the early history of life” (p. 440), por K. Lewalter y V. Müller, 2006, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(5-6).

A.



B.

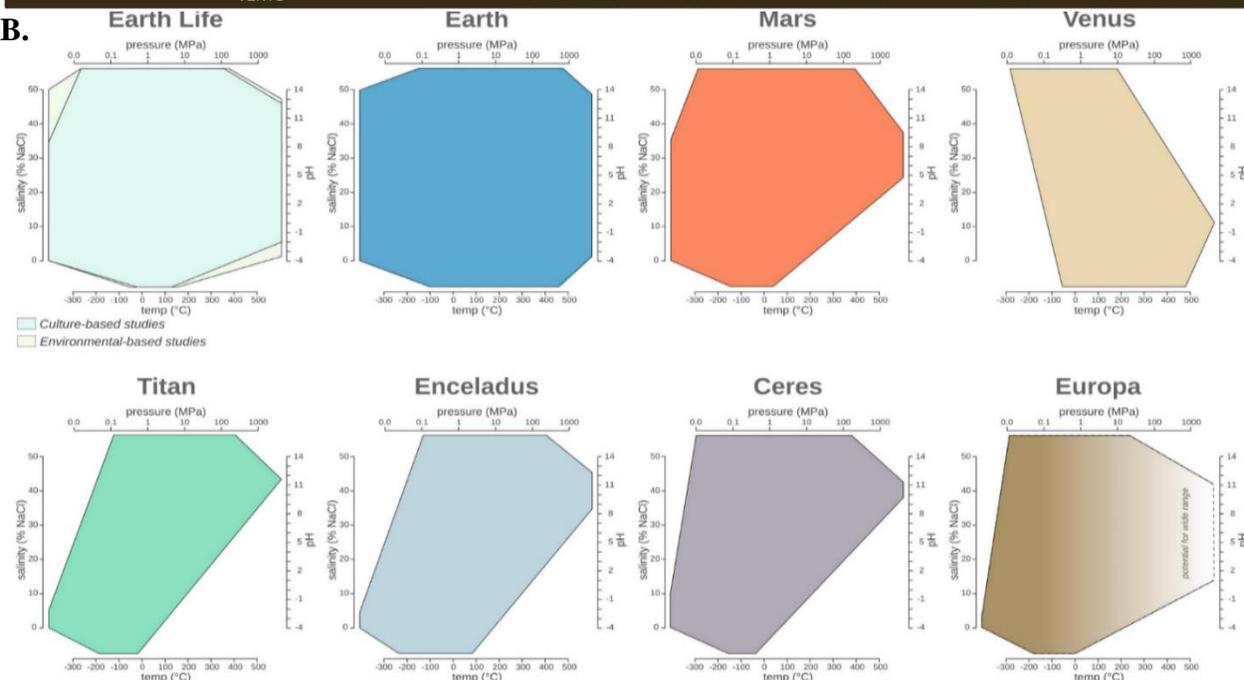


Figura 6. Ambientes extremos en la Tierra y extrapolación a otros ambientes planetarios. Representación de los principales ambientes extremos (A), y las variables: temperatura, presión, pH y salinidad de la vida en la Tierra en comparación con planetas y lunas del Sistema Solar para comparar potenciales análogos terrestres y su habitabilidad (B). Los valores de las variables están representados por un solo vértice en un eje, mientras que los valores faltantes están representados por la ausencia en los ejes correspondientes. *Nota. Adaptado de "Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context", por N. Merino et al., 2019, Frontiers in Microbiology, 10, 780.*

Por otra parte, se definieron dos filos más, a saber: Nanoarchaea, que actualmente comprende solo un aislado secuenciado, *Nanoarchaeum equitans*; y Korarchaeota, que no se considera un grupo monofilético, cuyos integrantes se conocen solo a partir de secuencias de RNA 16S e incluyen un gran grupo de arqueas no clasificadas de ramificación profunda (Figura 7), las cuales se han obtenido a través de muestras ambientales terrestres o marinas, cuya distribución está geográficamente aislada y permanece sin cultivar (Baker et al., 2020; Elkins et al., 2008).

Los estudios comparativos más recientes de las arqueas se han centrado en el potencial metabólico del *superphylum* denominado Asgard (Figura 7), permitiendo concluir que estos organismos son primordialmente organoheterotróficos que pueden producir y consumir hidrógeno. Dicha información sostiene la idea que indica que los eucariotas evolucionaron de una arquea mayormente relacionada con un miembro del filo Heimdallarchaeota, adquiriendo la facultad de usar el oxígeno y nitratos como aceptores finales de electrones mediante la transferencia horizontal de genes en una etapa posterior (López-García y Moreira, 2019).

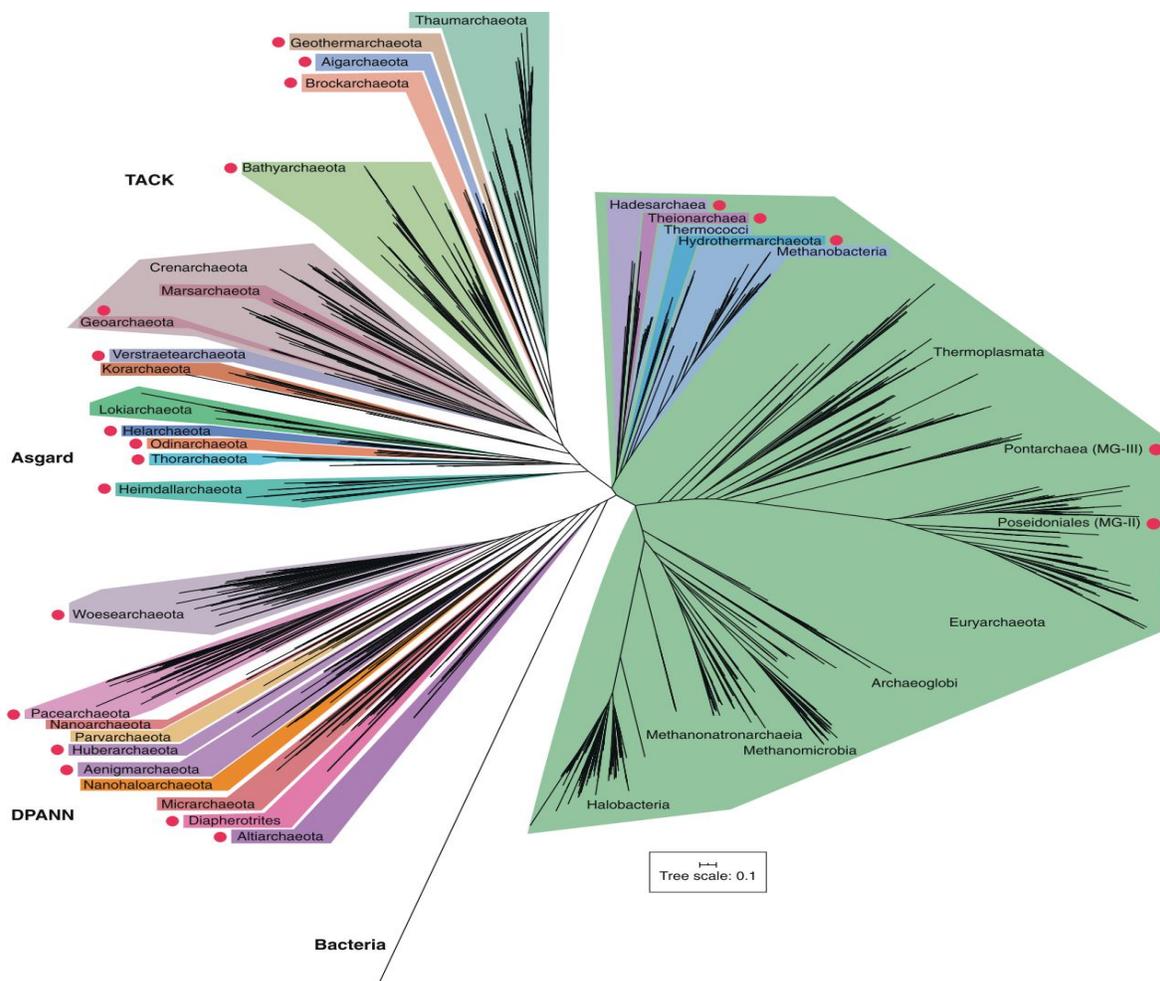


Figura 7. Filogenia actualizada de *Archaea*. Árbol generado con 3549 genomas de arqueas usando proteínas ribosomales marcadoras conservadas. Las ramas con puntos rojos no tienen organismos cultivados aún reportados. *Nota.* Adaptado de “Diversity, ecology and evolution of *Archaea*” (p. 889), por B. Baker, 2020, *Nature Microbiology*, 5.

El modelo simbiogénico involucra simbiosis metabólicas mediadas por hidrógeno o transferencia de electrones entre arqueas y bacterias. Basado en la reconstrucción metabólica del grupo Asgard y las consideraciones ecológicas, se propone el “modelo de flujo inverso”, el cual involucra el flujo de hidrógeno de las *Archaea* hacia los simbioses bacterianos; aunque el modelo especifica un arquea y una bacteria, se deja abierta la posibilidad de que las interacciones simbióticas con otros procariotas pudieron haber intervenido, en consonancia con recientes propuestas de simbiosis seriales (Spang et al., 2017). (Medina, 2019, pp. 19-20)

Las principales características del dominio Archaea son:

- Presentan membranas lipídicas que poseen cadenas laterales isoprenoides con enlaces éter en contraste con los hidrocarburos con enlaces éster de todos los demás sistemas biológicos (Van de Vossenberg et al., 1998).
- Carecen en todos los casos de ácido murámico (peptidoglicano) como constituyente de la pared celular. A su vez, están compuestos por pseudomureína (Visweswaran et al., 2011).
- Poseen una morfología típica que no se ha encontrado en ninguno de los organismos que componen el dominio Bacteria como, por ejemplo, las formas poligonales que tienen algunas arqueas halófilas o los cocos extremadamente irregulares que presentan algunos hipertermófilos (Oren, 1999).
- No catabolizan la glucosa mediante glicólisis, sino que emplean una vía metabólica de oxidación simple (Verhees et al., 2003).
- Su maquinaria fundamental de transcripción es muy similar a la que poseen los organismos pertenecientes al dominio Eukarya (Langer et al., 1995).
- Expresan histonas, con una gran diversidad de ellas involucradas en la regulación transcripcional (Henneman et al., 2018).
- Procesamiento de información en la replicación del DNA: la transcripción y la traducción (similar a Eukarya) (Forterre et al., 2002)
- Para la división celular las arqueas (Thaumarchaeota y Crenarchaeota) dependen del complejo ESCRT y los Euryarchaeota lo fundamentan en el FtsZ (Karlin et al., 2005; Makarova et al., 2010).
- En su membrana celular presentan apéndices afines con los pili tipo IV, los cuales pueden ser heredados por un ancestro común entre bacterias y arqueas o tener la posibilidad de ser transferidos de manera horizontal (Makarova et al., 2010).

El estudio y las investigaciones de estas características dentro de las áreas de la genómica, proteómica, metabólica, composición y función de membranas e interacción de virus y arqueas, ha sido posible gracias a uno de los modelos biológicos bien caracterizado dentro de las arqueas, esto es, el género *Sulfolobus*, cuyos organismos presentan una amplia cobertura geográfica y pueden cultivarse y manipularse en condiciones de laboratorio.

1.4.1 Características de *Sulfolobus* como modelo de estudio

Los miembros del género *Sulfolobus* (Figura 8) pertenecen al filo Crenarchaeota. Este género, de acuerdo con Brock et al. (1972), se describió por primera vez en 1972 y sus miembros se caracterizan por presentar células esféricas con lóbulos y una pared celular desprovista de peptidoglicano (Figura 9). Son autotróficos facultativos y con crecimiento aeróbico óptimo en su ambiente natural en aguas termales azufradas o solfataras, donde hacen uso de compuestos orgánicos simples. Asimismo, sus condiciones de crecimiento están en una temperatura entre 55 y 80 °C y con un pH < 2 y 3 (Bernander, 2007; Brock et al., 1972; Ceballos et al., 2012; Rice et al., 2001).

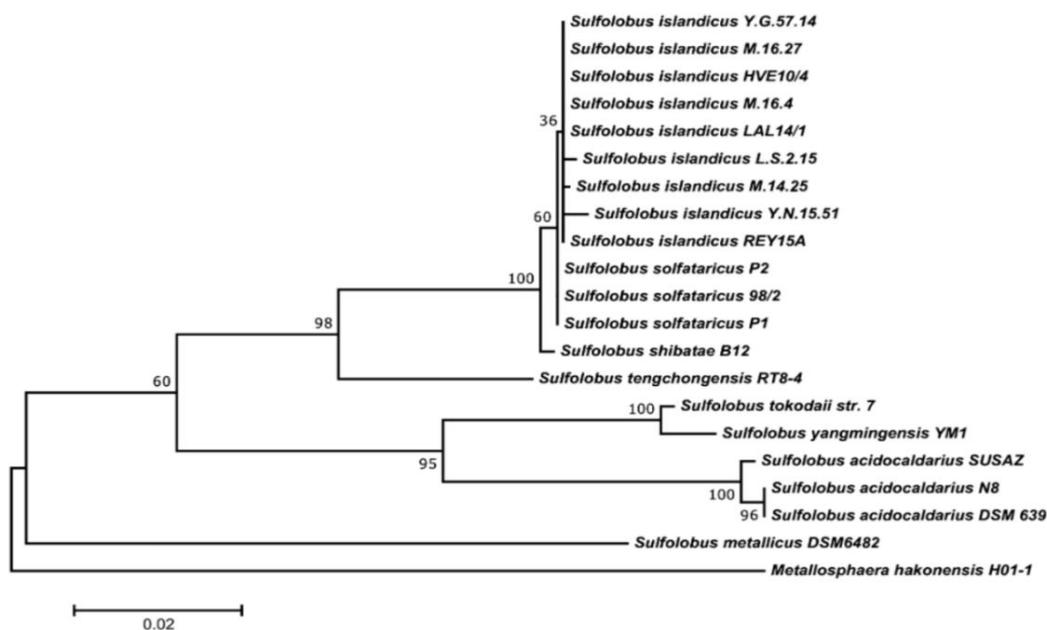


Figura 8. Árbol filogenético del género *Sulfolobus*. Basado en secuencias 16S rDNA, *Sulfolobus islandicus* y *Sulfolobus solfataricus* son las especies más abundantes y representativas de este género, siendo las más usadas en investigaciones. Se utilizó *Metallosphaera hakonensis* H01-1 como organismo de referencia comparativa. Nota. Adaptado de “*Sulfolobus* - A potential key organism in future biotechnology” (p. 2474), por J. Quehenberger et al., 2017, *Frontiers in Microbiology*, 8.

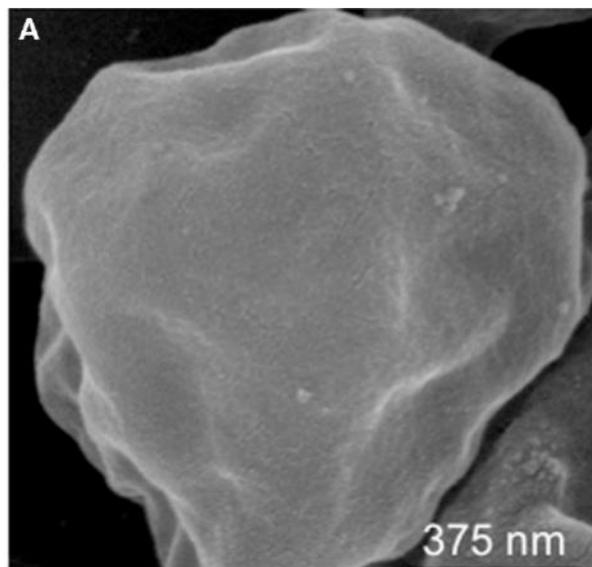


Figura 9. Célula de *Sulfolobus solfataricus*. Célula de *Sulfolobus solfataricus* G Θ por medio de una micrografía electrónica de barrido (SEM). A su vez, se destacan los lóbulos o protuberancias onduladas características de estos organismos. *Nota. Adaptado de “Differential virus host-ranges of the Fuselloviridae of hyperthermophilic Archaea: implications for evolution in extreme environments” (p. 295), por M. Ceballos et al., 2012, Frontiers in Microbiology, 3(AUG).*

Estos pueden crecer heterotróficamente utilizando compuestos orgánicos, o quimiolitotróficamente a través de la fijación de CO₂ (Bernander, 2007). De amplia distribución geográfica, se encuentran en manantiales de ácido caliente solfatárico (Held y Whitaker, 2009).

Hasta el momento se han secuenciado 17 genomas de *Sulfolobus*, lo que facilita la comparación en estudios de genómica (Figura 8). El contenido de GC (guanina y citosina) de la mayoría de las cepas de *Sulfolobus* secuenciadas equivale al 35 %, siendo menor para *Sulfolobus tokodaii* con un 32,79 %. Además, la comparación genómica de 10 cepas de *Sulfolobus islandicus* (LAL14/1, HVE10/4 y REY15A) reveló que hay un región central de 2Mb bien conservadas junto a regiones con reordenamientos variables a cada genoma (Jaubert et al., 2013). Sin embargo, se necesita más trabajo para revelar el mecanismo de regulación (Gristwood et al., 2012).

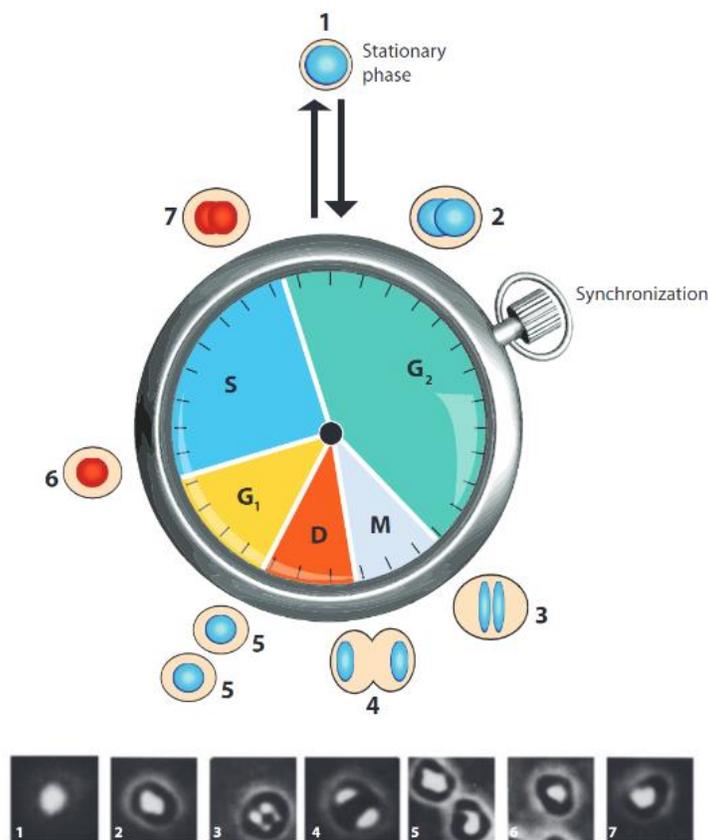


Figura 10. Ciclo celular de *Sulfolobus solfataricus*. El botón del cronómetro representa los métodos para la sincronización de *Sulfolobus acidocaldarius* en la etapa G₂. Los nucleoides azul y rojo corresponden al DNA que no se replica y que se replica respectivamente. Estas micrografías seleccionadas individualmente permiten evidenciar diferentes etapas del ciclo celular. *Nota. Adaptado de “The cell cycle of Sulfolobus” (p. 558), por R. Bernander, 2007, Molecular Microbiology, 66(3).*

Sulfolobus solfataricus (desde 2018 conocido como *Saccharolobus solfataricus*) (Sakai y Kurosawa, 2018) y *Sulfolobus islandicus*, se emplean como huéspedes para propagar diversos virus y plásmidos e interacción huésped-virus (Pina et al., 2011).

En fase estacionaria, todas las células de los cultivos de *Sulfolobus* contienen dos copias del genoma, lo que da como resultado un aumento en el contenido de DNA celular promedio en relación con un cultivo de crecimiento exponencial. Este ciclo se caracteriza por un breve periodo de pre-replicación y una extensa etapa de post-replicación que representa hasta el 70 % del tiempo de generación celular.

Con los estudios realizados hasta el momento, es posible plantear que en las células de los organismos sulfolobales se presenta un reordenamiento sustancial de la cromatina durante la entrada y salida del proceso mitótico respectivamente, y la alineación de nucleoides se observa a baja frecuencia (Figura 6) (Bernander, 2007). En contraste con Euryarchaeota y Crenarchaeota no exhibe *Filamenting temperature-sensitive mutant Z* (FtsZ), esto es, una proteína citoesquelética para la formación del tabique durante la división celular. Sumado a lo anterior, se ha encontrado que en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius*, los homólogos del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT) se encuentran en la celda media antes de la división celular (Braun et al., 2015; Cavicchioli, 2007)

Como las enzimas de las arqueas involucradas en la replicación del DNA son más similares a su contraparte de eucariota que a la bacteriana, un origen común del aparato de replicación eucariótico y de arquea se fortaleció aún más por la demostración de tres orígenes de replicación en los genomas de *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* (Gristwood et al., 2012). Sin embargo, todavía no está claro si todos estos orígenes se utilizan al mismo tiempo o si se inducen diferencialmente.

Como adaptación importante a su hábitat extremo, las membranas de las especies de *Sulfolobus* contienen una gran cantidad de lípidos tetraéter (hasta el 98 % de todos los lípidos de la membrana), lo que da como resultado una membrana monocapa, siendo así altamente impermeables a los protones, permitiendo que *Sulfolobus* mantenga un pH interno de 6,5 en un entorno muy ácido (Elferink et al., 1992; Schmidt et al., 1999; Van de Vossenberg et al., 1998).

El análisis comparativo de genes que codifican proteínas en *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, *Pyrococcus furiosus* y *Pyrococcus woesei*, permitió evidenciar que el género *Sulfolobus* se caracteriza por tener un alto contenido de A + T que el de C + G, y el uso de las bases presenta una distribución según su uso de mayor a menor así: A > T > G > C. En *Pyrococcus*, el contenido de A + T también es mayor que el de C + G, pero con valores relativamente más bajos y en el orden de uso de bases, G está precediendo a T (De Vendittis y Bocchini, 1996).

Asimismo, al comparar los contenidos de aminoácidos de estos organismos con mesófilos se encontró un aumento considerable en el promedio de los aminoácidos. Con este hallazgo se podría indicar un potencial mecanismo de adaptación de proteínas (por ejemplo, proteínas

termoestables) en organismos que viven en ambientes extremos (Sterner y Liebl, 2001). No obstante, las similitudes encontradas en la composición de bases en genes de proteínas de sulfotermófilos no son comunes a todo el dominio Archaea, puesto que surgen claras divergencias considerando, por ejemplo, el género *Halobacterium*, el cual presenta un mayor contenido de C + G que de A + T, lo que sugiere que existen relaciones taxonómicas distantes entre las diferentes ramas de Archaea (De Vendittis y Bocchini, 1996; Jaakkola et al., 2016; Macario et al., 2006).

El tamaño del genoma varía de 2 a 3 Mbp, y *S. solfataricus* tiene el genoma más grande (She et al., 2001). Esto se debe, en principio, al que el 11 % del genoma de *S. solfataricus* consiste en elementos móviles que incluyen más de 200 elementos de secuencias intactas diferentes; mientras que otras cepas de *Sulfolobus* contienen muy pocos elementos móviles. Se han reportado grandes reorganizaciones genómicas para las especies de *S. solfataricus* (Chen et al., 2005; She et al., 2001).

Conviene mencionar que las especies de *Sulfolobus* han sido una fuente para el aislamiento y caracterización de una gran cantidad de elementos genéticos extra genómicos como virus, plásmidos y plásmidos conjugativos (Prangishvili, 2013; Zillig et al., 1998). Actualmente, estos elementos se están estudiando intensamente y algunos de ellos se han utilizado para el desarrollo de herramientas genéticas (Berkner y Lipps, 2008).

Por otra parte, algunas especies de *Sulfolobus* crecen quimolitoautotróficamente, pero en el laboratorio se cultivan fácilmente en condiciones aeróbicas heterótrofas y presentan tiempos de duplicación de 3 a 6 horas. Con estas facilidades para su manejo fuera de hábitat natural, las especies de *Sulfolobus* se han convertido en organismos modelo para estudios sobre traducción, transcripción y replicación del DNA, reparación del DNA, división celular, procesamiento del RNA, metabolismo y muchos otros aspectos celulares como, por ejemplo, el proceso de infección causado por virus, los cuales son específicos a este dominio y se han denominado “archeovirus” (Beblo et al., 2009, 2011; Pina et al., 2011).

1.5 Virus en Archaea y específicos en Sulfolobales

Los virus son formas de vida parásitas con actividad intracelular que tienen una interesante relación específica de parasitismo con los miembros de los tres dominios de la vida en la Tierra (Archaea, Bacteria y Eukarya), jugando, incluso, un importante rol en la evolución de los organismos (Forterre, 2006; Pina et al., 2011; Prangishvili et al., 2017).

Esa relación virus-huésped ha llegado a implicar una coevolución de control natural con las poblaciones que ocupa (Prangishvili, 2013). De hecho, los virus tienen impactos ecológicos importantes en algunos ecosistemas, como el de ejercer el rol de materia orgánica en la base de cadenas tróficas, generando cambios en la fijación y ciclos del carbono, fósforo y nitrógeno (Wilhelm y Suttle, 1999). Al igual que los microorganismos, son los grupos biológicos más abundantes en la Tierra. Los virus que les infectan también son predominantes y dentro de los virus de Archaea se encuentran morfologías únicas y diferentes (Prangishvili, 2013), especialmente en los que se ubican en ambientes de temperaturas altas, bajo pH, hipersalinos y ambientes ácidos (Eme et al., 2017; Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006; Woese et al., 1990).

La gran mayoría de virus de arqueas aislados hasta ahora pertenecen a hipertermófilos e hiperhalófilos del Crenarchaeota y Euryarchaeota (Bize et al., 2009; Pina et al., 2011). Para el caso específico de la familia de virus de interés en este estudio, *Fuselloviridae* son los más abundantes en fuentes geotermales y sus huéspedes son miembros del género *Sulfolobus* (Ceballos et al., 2020; Pina et al., 2011).

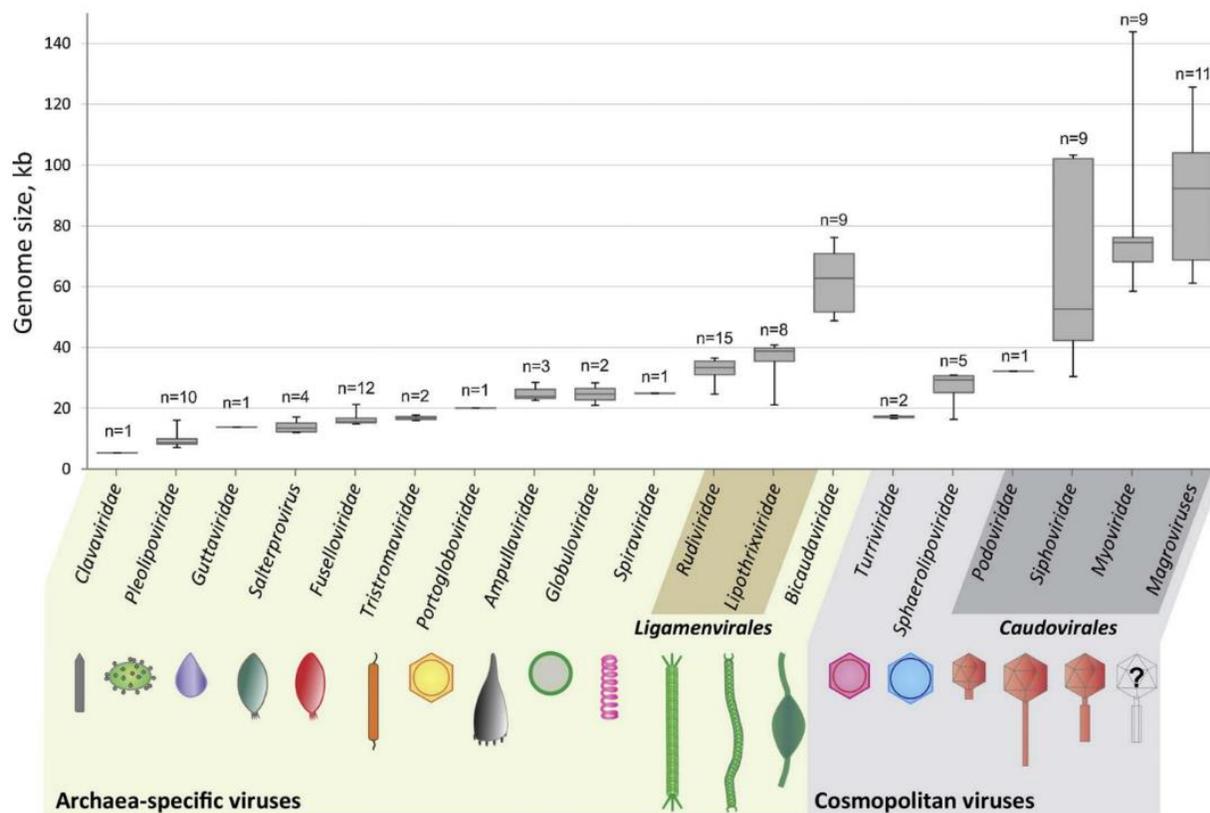


Figura 11. Morfotipos de virus en Archaea. La información sobre los tamaños del genoma se tomó de los registros de GenBank y de publicaciones donde se han usado genomas ensamblados a partir de datos metagenómicos. *Fuselloviridae* es una familia de virus específica en *Sulfolobus spp.* Las fracciones de virus cosmopolitas son menores en las arqueas en referencia a los virus específicos. *Nota.* Adaptado de “*Viruses of archaea: structural, functional, environmental and evolutionary genomics*” (p. 182), por M. Krupovic, 2018, *Virus Research*, 244.

Actualmente, los virus de las arqueas se encuentran clasificados en 17 familias (5 familias en dos órdenes) y un género aún sin asignación, tal como se muestra en la Figura 11. Gracias a la metagenómica se han descubierto virus de Archaea, pero no están clasificados por la falta de similitud notable con las especies previas ya clasificadas. Pese a ello, no se descarta que pueden ser nuevos taxones (Krupovic et al., 2018; Wang et al., 2019).

Para los *Sulfolobus spp.*, sus virus específicos se encuentran dentro de la familia *Fuselloviridae* y las especies caracterizadas en las investigaciones sobre virus destacan a los *Sulfolobus* Spindle-shaped Virus (SSV) (Bautista et al., 2015; Contursi et al., 2006; Goodman y Stedman, 2018; Quemin et al., 2016; Schleper et al., 1992; Zillig et al., 1993). Uno de los principales

representantes de esta familia es el arquetipo conocido como fusellovirus *Sulfolobus* (SSV1) aislado en una fuente geotérmica en Beppu, Japón (Prangishvili et al., 2001; Quemín et al., 2016; Rice et al., 2001). Este virus cuenta con una capa superficial proteica con simetría hexagonal con alta similitud a la geometría estructural del apéndice o “flagelo” del SSV1 (Rice et al., 2001).

1.5.1 Sulfolobus Spindle-shaped Virus (SSV)

Los virus de Archaea que han logrado ser aislados corresponden a ambientes con características termoácidas principalmente de los Estados Unidos (Rice et al., 2001), Japón (Yeats et al., 1982), Islandia (Zillig et al., 1993), Rusia y Nueva Zelanda (Stedman et al., 2003). Estos virus pertenecen mayormente al filo Crenarchaeota del género *Sulfolobus* (Zillig et al., 1998), debido a la relativa facilidad de aislamiento y cultivo aeróbico en laboratorio en comparación con organismos anaeróbicos del mismo filo.

De estos cultivos de *Sulfolobus*, los virus que se han logrado aislar, como se referenció en el apartado anterior, son los denominados *Fuselloviridae* (SSV) (Rice et al., 2001; Zillig et al., 1998), de los cuales se conocen 11 genomas (Tabla 1). Los SSV presentan una forma ovalada tipo limón, con un tamaño aproximado de $90\text{-}250 \times 60$ nm de longitud (Figura 12), tienen un genoma circular, superenrollado de dsDNA de 14,8 a 17,3 kb y codifica de 31 a 37 genes.

Respecto a su expresión génica, el DNA se integra específicamente en un gen de tRNA del cromosoma del huésped. A manera de recubrimiento, su morfología externa presenta una envoltura proteica hidrofóbica y en uno de los polos fibras dinámicas que pueden cumplir la función de fijación de las partículas del virus a la membrana celular de *Sulfolobus* o de su receptor (Prangishvili et al., 2001).

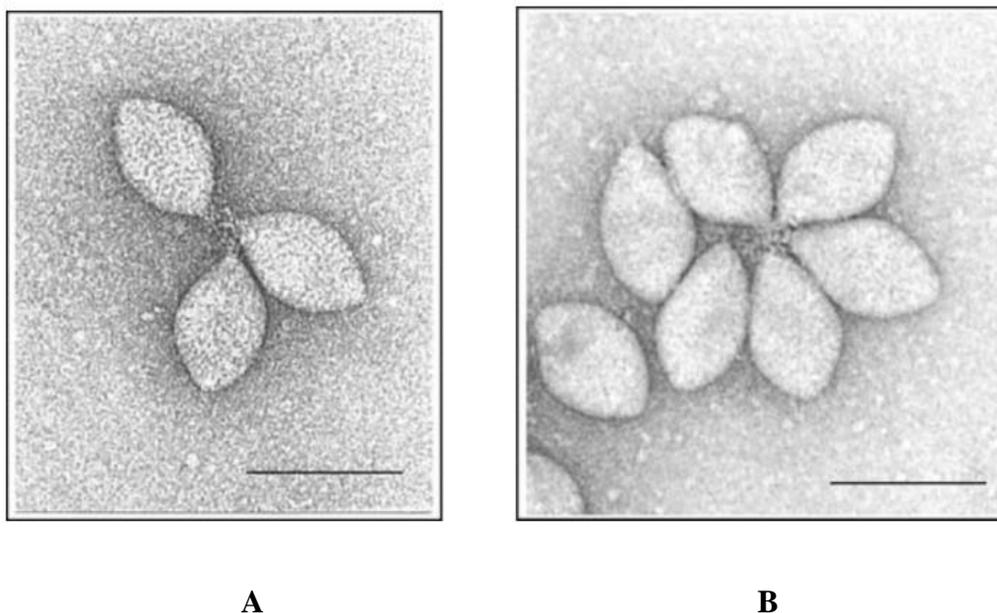


Figura 12. Micrografía de *Sulfolobus Spindle-shaped Virions*. Viriones de SSV1 (A) y SSV2 (B), cuya barra bar representa 90 nm. Tales viriones se obtuvieron por inducción con radiación ultravioleta sobre las células huésped de *Sulfolobus Solfataricus* P1. La morfología de los dos viriones observada por microscopio electrónico de barrido es prácticamente idéntica. *Nota. Adaptado de “Relationships between fuselloviruses infecting the extremely thermophilic archaeon Sulfolobus: SSV1 and SSV2” (p. 298), por K. Stedman et al., 2003, Research in Microbiology, 154(4).*

Dentro de la familia *Fuselloviridae* se destacan el SSV1, originalmente aislado de Beppu, Japón (Yeats et al., 1982), es el virus más estudiado del filo Crenarchaeota; SSV2 y pSSVx, aislados de *Sulfolobus islandicus* REY15/4 en un termal ubicado en Reykjanes, Islandia (Stedman et al., 2003; Zillig et al., 1998); *Sulfolobus Spindle-shaped Virus 8* (SSV8) (también conocido como SSVRH) (Goodman y Stedman, 2018; Menon et al., 2010), aislado de aguas termales con un pH de 3,2 y a una temperatura de 81 °C en la región de Ragged Hills del Parque Nacional Yellowstone, Estados Unidos (Rice et al., 2001; Snyder et al., 2003; Wiedenheft et al., 2004); y, finalmente, SSVK1, obtenido en la región de Geyser Valley del Parque Nacional de Uzhno Kamchatsky, Rusia (Rice et al., 2001; Snyder et al., 2003). A través de comparación genómica fue posible determinar que estos virus del tipo SSV son similares en tamaño y organización genética (Ortmann et al., 2006; Rice et al., 2001; Snyder et al., 2003).

En línea con lo anterior, SSV1 tiene una replicación alta y sus viriones se ensamblan y brotan del anfitrión (Stedman et al., 2003), formando una membrana de partículas en forma de huso (Quemin et al., 2016), y extendiéndose desde un extremo del huso. Por otra parte, SSV1 y SSV8 poseen fibras de cola corta que, presumiblemente, están involucradas con la unión de las partículas del virus a la membrana celular de *Sulfolobus* o su receptor (Menon et al., 2010; Snyder et al., 2003).

La morfología de este virus es similar a la morfología de His1, un virus que infecta a la halófila *Haloarcula hispánica* (Bath y Dyall-Smith, 1998), y una partícula similar al virus de *Methanococcus voltae* (Wood et al., 1989). Este es el primer ejemplo de una morfología viral común entre Euryarchaeota y Crenarchaeota. La producción de partículas de SSV1 en cultivo puede ser inducida por irradiación UV o tratamiento con mitomicina C, dando como resultado la lisis de la célula huésped (Schleper et al., 1992; Stedman et al., 1999). Aún no se ha establecido si otras SSV también pueden inducirse mediante irradiación o tratamiento químico. Todos los SSV tienen genomas circulares de dsDNA y codifican para aproximadamente 35 marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) (Rensen et al., 2016; Stedman et al., 2003). En términos generales, los ORF están estrechamente dispuestos en el genoma. Parece haber pocas regiones no codificantes. La gran mayoría de estos ORF muestran poca o ninguna similitud con otros genes en las bases de datos públicas. Incluso, cuando se comparan los genomas de cuatro SSV de ubicaciones muy distantes, algunos ORF muestran solo una similitud limitada entre los aislados (Snyder et al., 2003).

SSV1 y SSV8 presentan DNA circular de doble hebra que codifican 34 y 38 ORF de acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 1, respectivamente (Menon et al., 2010; Wiedenheft et al., 2004). Solo cuatro de los ORF de SSV1 tienen funciones asignadas. SSV1 codifica una integrasa para la inserción de su genoma en un gen tRNA^{ARG} en el genoma del huésped *Sulfolobus* (Palm et al., 1991). Otros tres ORF codifican las proteínas estructurales virales (VP1, VP2 y VP3). Solo SSV1 contiene las tres proteínas virales (Quemin y Quax, 2015). Otros aislamientos de SSV de Islandia, Rusia y EE. UU. contienen VP1 y VP3, pero carecen de VP2 (Snyder et al., 2003).

Genoma y locación	Tamaño (pares de bases)	Marcos abiertos de lectura (ORF)
ASV1 (ISL)	24.186	38
SSV1 (JPN)	15.465	35
SSV2 (ISL)	14.795	35
SSV3 (ISL)	15.230	32
SSV4 (ISL)	15.135	34
SSV5 (ISL)	15.330	34
SSV6 (ISL)	15.684	33
SSV7 (ISL)	17.602	33
SSV8 (USA)	16.473	37
SSV9 (RUS)	17.385	31
SSV10 (USA)	16.271	40

Tabla 1. Genomas de *Fusellovirus*. SSV1 y SSV8 presentan DNA circular de doble hebra que codifican 34 y 38 ORF, respectivamente. Solo cuatro de los ORF de SSV1 tienen funciones asignadas. *Nota.* Adaptado de “Comparative genetic and genomic analysis of the novel fusellovirus *Sulfolobus spindle-shaped virus 10*”, por D. Goodman y K. Stedman, 2018, *Virus Evolution*, 4(2).

Se cree que tres formas diferentes del genoma de SSV pueden coexistir en una célula infectada: la copia integrada y las formas episomales superenrolladas tanto positiva como negativamente del genoma (Stedman et al., 2003). Asimismo, se desconocen las funciones biológicas de cada forma, pero se propone que la forma integrada se utiliza como plantilla para la transcripción, la forma superenrollada positiva se emplea para encapsularse dentro de la partícula de virus, y la forma superenrollada negativa se utiliza como plantilla para replicación del genoma (DeYoung et al., 2011; Wood et al., 1989).

Como se expuso anteriormente, la diversidad y especificidad de los virus que infectan a las arqueas y dentro de este dominio al género *Sulfolobus* es amplia, el comportamiento de la célula huésped y su parásito orientan en la dinámica que los procesos infectivos y las potenciales consecuencias para cada uno de los actores en esta interacción.

1.6 Características de la interacción virus-hospedador

Los virus dependen completamente del mecanismo del huésped (Archaea, Bacteria o Eukarya) para liberar su genoma y replicarse para iniciar la producción de más viriones (Forterre, 2006). Cuando una célula está infectada con un virus, el resultado de esta acción depende del tipo de virus que causa la infección, el tipo de célula huésped y el estado funcional de esa célula

(Munson-Mcgee et al., 2018; Payne, 2017). El ciclo de replicación del virus implica una serie de pasos generales que requieren mecanismos y proteínas presentes en la célula huésped.

1. La unión celular y la entrada posterior dependen del reconocimiento específico de los receptores de la superficie celular y la entrada depende de varios. Las células huésped suelen utilizar un mecanismo de endocitosis, tal como se ilustra en la Figura 13 (Forterre y Prangishvili, 2009; Prangishvili, 2013; Quemin y Quax, 2015).

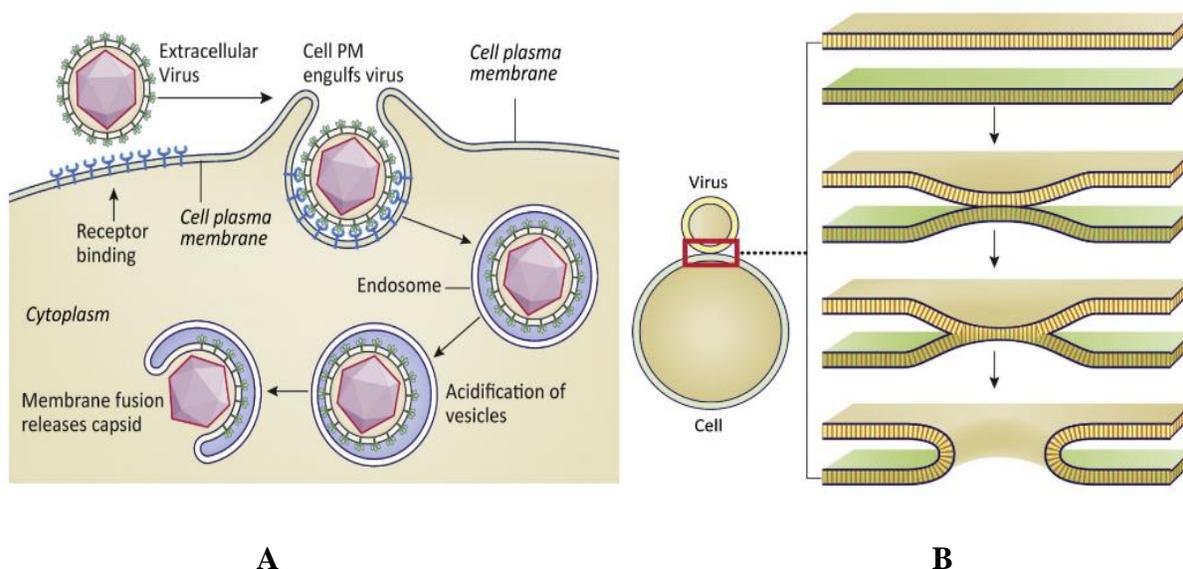


Figura 13. Representación de la interacción virus-célula. El proceso de fusión de membranas entre virus y huésped (A) y el ingreso del virus por endocitosis (B). El pH bajo en la endosoma desencadena reordenamientos moleculares de las proteínas de la cápside. Asimismo, se evidencia que un virus se fusiona con una membrana endosomal para liberar la cápside en el citosol. *Nota. Adaptado de "Virus interactions with the cell", por S. Payne, 2017, Viruses.*

2. Los virus DNA ya deben transcribir y replicar el genoma en la célula y traducir proteínas. En todos estos procesos, los virus utilizan diversos mecanismos para manipular los mecanismos celulares, promover el ciclo de replicación y dañar al huésped (Payne, 2017; Wood et al., 1989).
3. Para completar el ciclo, un virus recién ensamblado abandona las células consumidas e infecta nuevas células y continúa multiplicándose (Payne, 2017). En todos estos procesos,

existen numerosas interacciones entre el virus y la proteína celular, a través de las cuales el virus puede redirigir favorablemente la función de la proteína celular (Khayat et al., 2005; Lawrence et al., 2009).

Si la replicación viral es eficaz, por lo general, destruye la célula huésped cumpliendo así con el ciclo lítico, lo que lleva a una infección persistente en las células supervivientes, puesto que continúan produciendo partículas virales infectivas (Bize et al., 2009; Quemin y Quax, 2015; Schleper et al., 1992).

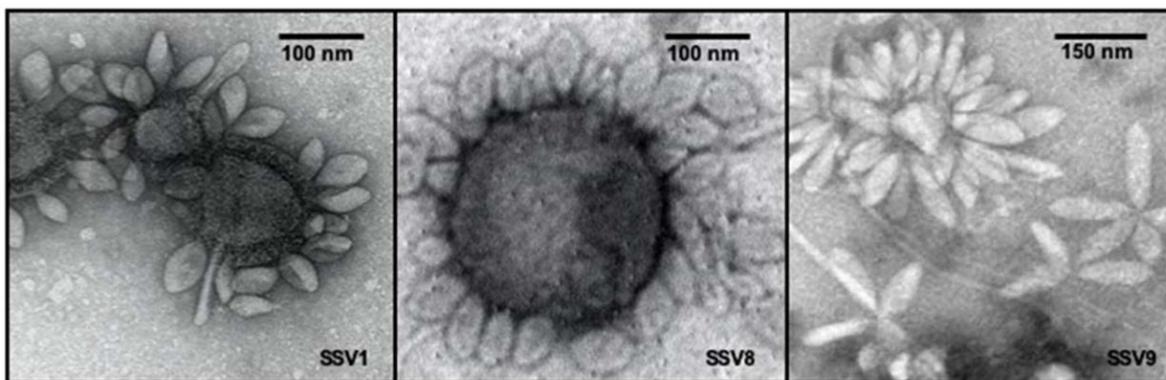


Figura 14. Micrografías de infección por SSV en *Sulfolobus*. Viriones de tres tipos de virus: SSV1, SSV8 y SSV9 en proceso de infección a células sulfolobales en cultivo. Los viriones tienden a ubicarse a manera de “pétalos de girasol” alrededor de la célula para iniciar su entrada en la membrana. En la expulsión de viriones el egreso se da sin generar la lisis de la célula huésped. *Nota. Adaptado de “Differential virus host-ranges of the Fuselloviridae of hyperthermophilic Archaea: implications for evolution in extreme environments” (p. 295), por M. Ceballos et al., 2012, Frontiers in Microbiology, 3(AUG).*

En el caso de *Sulfolobus*, su relación de reproducción es de carácter “no lítico”, en específico para el caso de los virus SSV, como se observa en la Figura 14. Esta vía de reproducción viral hace referencia a la inhibición del crecimiento que el virus produce en el huésped sin generar la muerte de las células (Ceballos et al., 2020).

Hay otros tipos de infecciones persistentes en las que está presente el genoma del virus, pero no se produce ningún virus infeccioso. Estas infecciones se denominan infecciones latentes y se ha detectado cierta expresión de genes virales (Bautista et al., 2015; Payne, 2017). Las infecciones cambiantes pueden ocurrir cuando la información genética del virus se incorpora al genoma de la

célula huésped como DNA o se transporta como DNA fragmentado (Forterre, 2006). Diferentes virus de DNA y RNA pueden afectar la expresión génica, modificando directamente el genoma de la célula huésped. Esta inhibición de la síntesis de DNA del huésped puede ser un efecto directo de factores virales en el núcleo o un resultado secundario de la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula huésped. El producto viral afecta de manera concreta la actividad de la RNA polimerasa de las células y también puede inhibir la síntesis de RNA del huésped (Forterre, 2006; Forterre y Prangishvili, 2009).

En suma, la relación virus-célula tiene un nivel evolutivo, dado que estos parásitos han sido considerados como gestores y estimuladores evolutivos de la vida en la Tierra, puesto que la vida como se conoce ahora no sería posible sin su presencia y esto es de gran relevancia desde el punto de exploración de la astrobiología (Berliner et al., 2018). Para efectos de esta investigación se establece que la respuesta a una infección viral expresada en la producción de proteínas que cumplan potenciales funciones de defensa o de regulación son un punto de partida para entender y extender las internaciones virus-hospedero en el dominio Archaea.

2 Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

Se ha establecido y comprobado que el estrés térmico es una condición que perturba la homeostasis de la célula de *Sulfolobus* y su respuesta a este cambio en la temperatura se manifiesta a través de la alta producción de proteínas de choque térmico (HSP) o chaperoninas del grupo II (Termosoma), las cuales no solamente son termoestables, sino que también son tolerantes a los ácidos.

Esto sugiere que las chaperoninas que conforman el termosoma de *Sulfolobus* pueden desempeñar un papel más amplio en la célula que el de solo responder al choque térmico, por lo consiguiente podría también responder a varios tipos de estresores ambientales.

Como se destacó en la introducción, la infección viral puede considerarse otro tipo de estresor ambiental y en la relación entre *Sulfolobus* Spindle-shaped Virus 8 (SSV8) y células de *Sulfolobus solfataricus* P2 se ha demostrado una alta efectividad en la infección dando como resultado la inhibición del crecimiento del hospedador.

Dado que en las investigaciones previas realizadas entre Sulfolobales y SSV no se ha abordado la relación entre las HSP y la infección viral, la hipótesis de este estudio se basa en que la formación de complejos de proteínas de choque térmico (HSP) está determinada por un grupo previo de subunidades de HSP en la célula, y que la expresión de estas proteínas está regulada por la infección del SSV, de forma similar al estrés causado por choque térmico.

Asimismo, es relevante evaluar y comparar si se produce la estabilización o asimilación por parte de la célula huésped de esa condición estresante por infección viral, algo que ocurre con el choque térmico donde la sobreproducción de HSPs se reduce cuando el factor estresante ha sido asimilado por el organismo.

De aquí surgen las preguntas: ¿Están las proteínas de choque térmico (HSP) de *Sulfolobus* reguladas al alza en presencia de factores estresantes distintos del choque térmico, en este caso, infección por *Sulfolobus* Spindle-shaped Virus 8 (SSV8)? ¿Son diferentes estos niveles de expresión comparados con los presentados en el choque térmico?, ¿Cómo se expresan las subunidades que conforman el complejo proteico HSP α y HSP β en respuesta al estrés por

infección viral? Para responder a estas cuestiones y verificar la hipótesis, en este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

2.2 Objetivos

1. Determinar la respuesta regulatoria del complejo de proteínas de choque térmico (HSP) en respuesta a infección por SSV8 en organismos sulfobales usando como modelo el par *Sulfolobus sulfataricus* P2 como huésped y el virus SSV8.
2. Identificar y cuantificar los niveles de expresión de las proteínas de choque térmico (HSP) que se presentan en *Sulfolobus* ante la infección por SSV8 y compararlo con el choque térmico.
3. Identificar patrones de expresión diferencial de las distintas subunidades de complejos de HSP, particularmente de las subunidades HSP α y HSP β y su relación con los diferentes factores estresantes.

3 Materiales y métodos

3.1 Cepas y medios de cultivo

3.1.1 Cepas de *Sulfolobus solfataricus* P2

Sulfolobus solfataricus P2 (DSM 1617) fue aislado de aguas termales cerca de Pisciarelli, Italia (She et al., 2001). Las muestras de esta cepa se identifican como S437 en el Laboratorio del Dr. Michael Ceballos de la Universidad de Arkansas (Fayetteville-USA). Los viales de 1,8 mL (Vial Criogénico 1,8 mL NALGENE) contenían 1080 µL de la cepa de S437 y 720 µL de Glycerol al 20 %, y ubicados dentro del congelador (Portable -86 °C freezer 25 liter ULT25NEU) a una temperatura de -80 °C.

3.1.2 Cepa de virus *Sulfolobus Spindle-shaped* SSV8

Sulfolobus Spindle-shaped Virus 8 (SSV8), también conocido como SSVRH, fue aislado de aguas termales la región de Ragged Hills del Parque Nacional Yellowstone (Wiedenheft et al., 2004). Las muestras del virus se identifican como S800 en el Laboratorio del Dr. Michael Ceballos en la Universidad de Arkansas (Fayetteville-USA). Los viales de 1,8 mL (Vial Criogénico 1,8 mL NALGENE) contenían 1080 µL de la cepa de S800 y 720 µL de Glycerol al 20 %, y ubicados dentro del congelador (Portable -86 °C freezer 25 liter ULT25NEU) a una temperatura de -80 °C.

3.2 Medios de cultivo

El medio de cultivo se preparó de acuerdo con el protocolo usado en el Laboratorio del Dr. Ceballos en la Universidad de Arkansas (Fayetteville-USA) (Ceballos et al., 2012; Ceballos et al., 2020).

En un *beaker* de 1 L de volumen ubicado en una plataforma agitadora y una barra magnética (Isotemp-Fisher Scientific) se agregaron los siguientes compuestos:

Trypton-Sacarosa:

- a) 3,0 g / l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- b) 0,7 g / l de glicina.

- c) 0,5 g / l de K_2HPO_4 .
- d) 1,0 g / l de Sacarosa.
- e) 2,0 g / l de Tripton.
- f) 200,0 μ l / 1 l % $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.
- g) 244,0 μ l / 1 l % $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$.
- h) 90,0 μ l / 1 l % $MnCl_2 \cdot 4H_2O$.
- i) 11,0 μ l / 1 l % $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.
- j) 2,5 μ l / 1 l % $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.
- k) 1,5 μ l / 1 l % $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$.
- l) 1,5 μ l / 1 l % $VO_2SO_4 \cdot 5H_2O$.
- m) 0,5 μ l / 1 l % $CoCl_2 \cdot 6H_2O$.
- n) 0,5 μ l / 1 l % $NiSO_4 \cdot 6H_2O$.
- o) 1 mL / 1 l, 0 M $MgCl_2$ / 0.3 Solución M Ca $(NO_3)_2$.

El pH se ajustó entre 3,0 y 3,2 con H_2SO_4 según el balance final.

3.2.1 Cultivos de cepas

La cepa de *Sulfolobus solfataricus* P2 S437, se retiró del congelador de $-80\text{ }^\circ\text{C}$ y el hielo se descongeló parcialmente. Luego se procedió a generar el cultivo semilla en tubos de ensayo de vidrio de borosilicato (18x150mm Fisherbrand), agregando 30 μ l de suspensión de células del *stock* a 10 ml de medio de cultivo Tripton-Sacarosa para S437.

Los tubos de ensayo se sellaron parcialmente con papel metálico para evitar la evaporación y se ubicaron en un segundo contenedor (Figura 15, A) en una incubadora con agitación (IST-4075 Lab Companion JeioTech) a $76\text{ }^\circ\text{C}$ y 120 rpm (revoluciones por minuto).

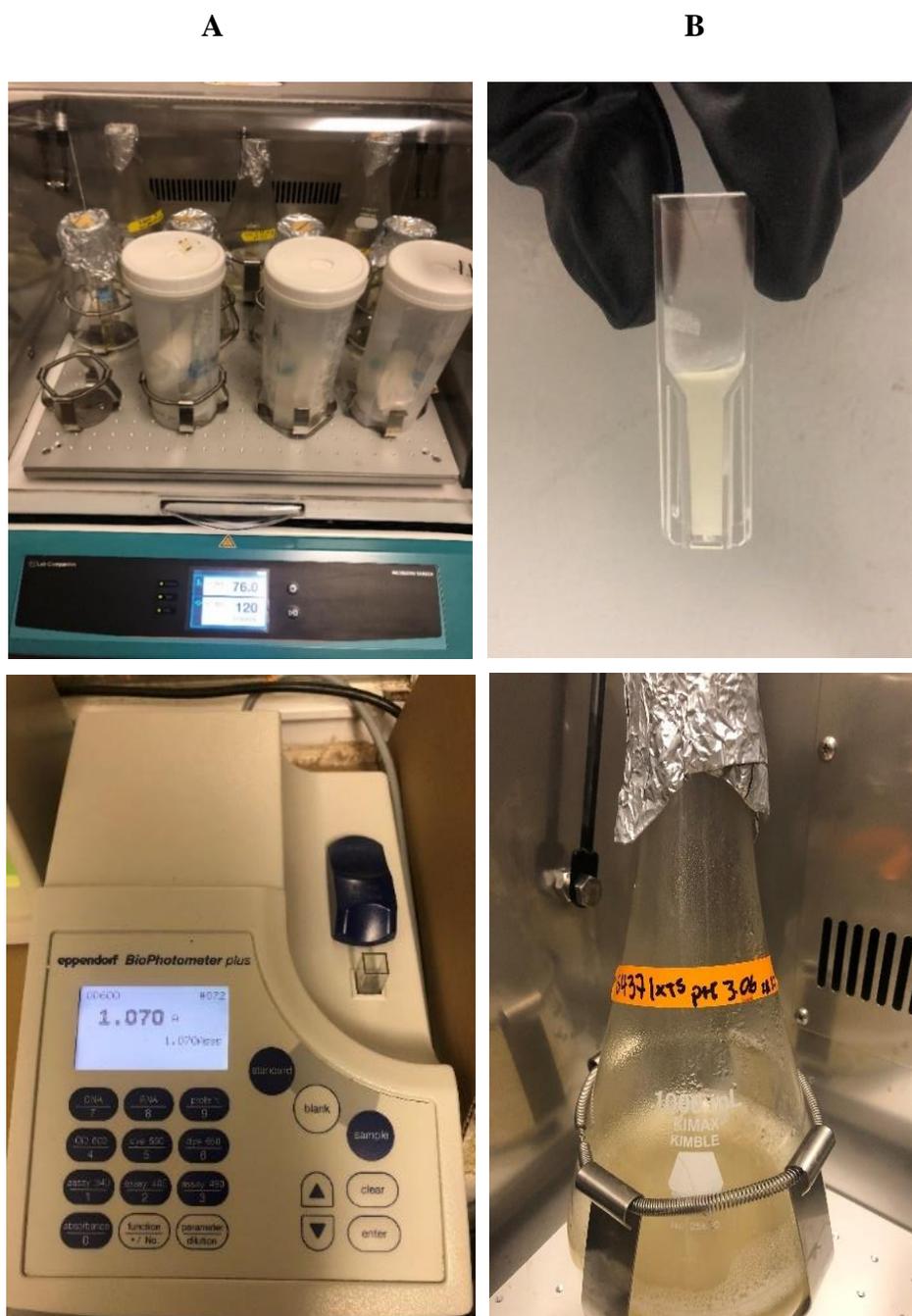


Figura 15. Cultivo semilla de S437. Para el cultivo de semilla de S437 se utilizó un contenedor secundario para disminuir el riesgo de contaminación, pero garantizando el acceso de flujo de aire para la oxigenación de las potenciales células (A). La turbidez blanquecina del cultivo también es un indicador cualitativo de crecimiento positivo (B). A nivel cuantitativo, el biofotómetro determinó la fase de crecimiento (C), y se presentó un escalamiento a mayor volumen del cultivo semilla (D).

Para medir la densidad óptica OD_{600} , se colocó una muestra del medio cultivado de un volumen de 1 mL en un Eppendorf™ Vis Cuvette (Figura 15, B). El dato se tomó con biofotómetro (Figura 15, C) (Eppendorf BioPhotometer plus).

Cuando el cultivo inicial de *Sulfolobus solfataricus* P2 alcanzó un valor entre 0,4 – 0,6 (para choque térmico) y 0,15 – 0,20 (para infección por SSV8), se procedió a realizar un escalamiento a mayor volumen (Figura 15, D) en un matraz de vidrio borosilicatado con deflectores de 250 mL o 1000 mL (Kimax-Kimble N. 25630), tomando 300 μ L o 1 mL del cultivo semilla e inoculando a 100 o 300 mL del medio cultivo precalentado a 76 °C. Los matraces se sellaron parcialmente con papel metálico para evitar la evaporación, continuando así con la incubación a 76 °C y 120 rpm hasta el próximo paso experimental.

3.2.2 Cultivo de Cepa de virus y extracción

La siembra del cultivo semilla se llevó a cabo con el mismo procedimiento que las cepas no infectadas. Asimismo, el escalamiento a mayor volumen se realizó en matraces de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo Tripton-Sacarosa. Para maximizar la producción de virus se esperó a que el cultivo alcanzara una densidad óptica entre 0,6-0,8 y, de esa manera, se distribuyó en tubos de polipropileno de 50 mL de volumen para centrifugación (Fisherbrand Ref. 05-539-8, Fisher Scientific).

Posteriormente, el cultivo se centrifugó durante 40 minutos a 3800 rpm (Centrifuga Sorvall RT600D con rotor de ángulo) para sedimentar la masa celular, dejando el virus en suspensión en el sobrenadante. Este sobrenadante se decantó y filtró a través de un sistema de filtrado al vacío con filtro de 0,45 μ m (Nalgene™ Thermo Fisher). El volumen obtenido después del filtrado se concentró por centrifugación a 3000 rpm por 30 minutos, empleando tubos de concentración CentriconPlus-70 de 10 kDa (Millipore Corp., Billerica, MA, EE. UU.). Este procedimiento se repitió hasta obtener un volumen de 1,5-1,8 mL de filtrado del sobrenadante con virus de SSV8. Finalmente, la solución que contenía los virus aislados se almacenó a 4 °C entre 2 a 3 semanas posteriores hasta su nuevo uso.

3.3 Preparación en las cajas de Petri y medio sólido

- a. Se preparó 1 L de medio de cultivo de Tripton-Sacarosa (2XTS) bajo el mismo procedimiento mencionado en el apartado relacionado con los medios de cultivo. Esta vez, se empleó el doble de concentración en cada uno de los compuestos usados y en el literal (e) 2g de levadura en reemplazo del Tripton. Este medio se fraccionó en dos partes de 500 mL, uno para autoclave (H1CLAVE HV-25 HMC-Europe GmbH) y el otro quedó sin esterilizar.
- b. En vaso de precipitación de 1 L de volumen se calentó moderadamente (60 °C – 80 °C), 500 mL de medio de cultivo Tripton-Sacarosa (2XTS) en una placa de calor y agitación y con una barra de agitación magnética que contiene 500 mL del medio de cultivo del apartado anterior 2XTS (sin solución de $MgCl_2 / 0,3 M Ca (NO_3)_2$ del literal (o)).
- c. En otra placa de calor y agitación se colocó un vaso de precipitado de 1 L de volumen con 400 mL de agua destilada a 120 °C – 140 °C y se ajustó con agitación rápida.
- d. Se pesaron 10 g de Gel-Rite™ y se agregó lentamente al agua caliente.
- e. El Gel-Rite se disolvió por completo sin la formación de grumos (esto puede normalmente tardar entre 20 y 30 minutos).
- f. Después de que Gel-Rite™ se disolvió, se llevó a volumen final de 500 mL usando agua destilada.
- g. Con guantes de protección al calor, se vertieron lentamente los 500 ml restantes del medio 2XTS del literal (a) en el otro vaso de precipitados de 1,0 L del literal (b).
- h. Se permitió agitación durante 1 minuto, luego se agregó 1 ml de solución estéril de $MgCl_2/0,3 M Ca (NO_3)_2$.
- i. Luego, con 1 minuto más de agitación, el contenido se vertió lentamente en cajas de Petri de perfil profundo (Petri Dish Carolina Biological Supply 25X150).
- j. De esa manera, se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que el Gel-Rite™ se solidificó (aproximadamente 20 minutos).
- k. Finalmente, se etiquetó y almacenaron las cajas en una bolsa de plástico a 4 °C.

3.3.1 Verificación de virus por ensayo de Halo

- a. Se tomaron tres cajas de Petri y se precalentaron a 80 °C en la incubadora.
- b. Se pesaron 0,08 g de Gel-Rite™ y se agregó a 20 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 50 mL colocado en una placa de calor, agitando con una barra de agitación magnética, permitiendo que el Gel-Rite™ se mezclara y se disolviera completamente.
- c. Una vez disuelto el Gel-Rite™, se agregaron 20 ml de medio 2XTS estéril preparado en el literal (a) de las cajas de Petri. Esto se realizó cerca a llama de mechero para crear un ambiente estéril.
- d. Se mezcló durante 2 minutos y, luego, el vaso de precipitado se retiró de la placa para permitir que se enfriara por 2 minutos a temperatura ambiente.
- e. Posteriormente, el vaso de precipitados se colocó en la incubadora por 5 minutos para estabilizar la temperatura a 80 °C (~ 5 min).
- f. De los cultivos semilla de las cepas preparados anteriormente, se tomaron 500 µL de suspensión celular, las cuales se ubicaron en tubos de ensayo de vidrio de borosilicato (18x150mm Fisherbrand) para realizar el baño de agua a 80 °C (P5 baño de agua con recirculación Thermo Haake DC 10).
- g. Para preparar la “capa blanda” de gel, se agregaron 4,5 mL de solución 2XGR / 2XTS a cada uno de los tubos de ensayo que contenían los 500 mL de suspensión celular. Esto se realizó cerca de una llama de mechero.
- h. Todo el contenido (5 mL) se vertió a cada caja de Petri, girando suavemente para distribuir uniformemente la “capa blanda” y cubriendo de inmediato.
- i. Se dio paso a la solidificación de la “capa blanda” durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente.
- j. Después de que la “capa blanda” se solidificó, se rotularon las cajas de Petri en su base y se marcaron las siguientes ubicaciones: TritonX-100, cepas virus a detectar y H₂O.
- k. Se agregó 1 µL de TritonX-100 sobre la “capa blanda” en el área marcada (control positivo).

- l. Se incorporó 1 μL de sobrenadante viral sobre la “capa blanda” en el área marcada.
- m. Se agregó 1 μL de H_2O sobre la “capa blanda” en el área marcada (control negativo).
- n. Finalmente, se dejaron precalentar las cajas de Petri en la incubadora a 80 °C durante 2 minutos para absorber las sustancias colocadas anteriormente.
- o. Después de los 2 minutos, se invirtieron las cajas de Petri y se colocaron en una caja plástica con una toallita húmeda.
- p. Inmediatamente, el recipiente con las cajas se ubicó en la incubadora a 80 °C.

3.3.2 Titulación por virus: unidades formadoras de halos (conteo de virus)

Para este ensayo se realizaron los mismos pasos mencionados en el literal *a* al *f* del numeral

3.3.1. De los virus SSV8 obtenidos, se tomó 1 mL de solución de cada una de las 24 horas post infección (HPI) y se realizaron diluciones 10^{-1} a 10^{-6} en medio TS.

- a. Para preparar la “capa blanda” de gel, se agregaron 4,5 mL de solución 2XGR / 2XTS a cada uno de los tubos de ensayo que contenían los 500 μL de suspensión celular, cerca de una llama de mechero. Se preparó uno por cada dilución.
- b. Luego, se agregaron 100 μL de cada dilución de SSV8 a los 500 μL de suspensión celular colocados en tubos de ensayo de vidrio de borosilicato (18x150mm Fisherbrand) y se llevaron a baño de agua a 80 °C (P5 Baño de agua con recirculación Thermo Haake DC 10) por 15 minutos.
- c. Posteriormente, se vertió todo el contenido (5,1 mL) de cada tubo de ensayo en cada caja de Petri (Petri Dish Carolina Biological Supply 25X150), girando suavemente para distribuir uniformemente la “capa blanda” y cubriendo de inmediato.
- d. Lo anterior, dado paso a la solidificación de la “capa blanda” durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente.
- e. Después de que la “capa blanda” se solidificó, se rotularon las cajas de Petri en su base de acuerdo con el tipo de dilución del virus SSV8 (10^{-1} a 10^{-6}) usada en cada una, y luego se ubicaron en una incubadora a 80 °C. Cada muestra se trabajó por triplicado.

- f. Las placas empezaron a aparecer después de 24 horas, pero se hicieron más visibles después de 48 horas de incubación. Se contaron las Unidades Formadoras de Halos (HFU, por sus siglas en inglés) y la titulación (conteo) de la suspensión original de virus aislado (HFU/ml) se calculó de la siguiente manera:

Titulación de virus = halos observados / volumen de solución viral añadido * factor de dilución.

3.4 Determinación de las curvas de crecimiento

Después de tener el cultivo semilla descrito en el apartado 3.2.1 y cuando la densidad óptica OD₆₀₀ alcanzó un valor entre 0,4 y 0,6, se escaló a mayor volumen en un matraz de vidrio borosilicatado de 1000 mL (Kimax-Kimble N. 25630), se tomó 1 mL del cultivo semilla para inocularlo a 300 mL del medio cultivo 1XTS (Trypton-Sacarosa), y se precalentó por 45 minutos a 76 °C. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado. Los matraces se sellaron parcialmente con papel metálico para evitar la evaporación y se continuó con la incubación a 76 °C y 120 rpm.

La densidad óptica OD₆₀₀ se tomó con BioPhotometer Plus Eppendorf cada 4 horas en cada réplica y los datos se consignaron en formato Excel para su posterior procesamiento. Para el procesamiento de estos datos se utilizó el software R Tidyverse y las visualizaciones se realizaron con el paquete Ggplot2 (Wickham et al., 2019). El área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) se calculó mediante aproximaciones de suma de Riemann (Ceballos et al., 2020) con el paquete DescTools (Andri., et al. 2021). El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con Ceballos et al. (2020). Asimismo, las barras de error en los gráficos de la curva de crecimiento con AUC representaron los intervalos de confianza del 95 %.

Finalmente, la diferencia entre las muestras infectadas y no infectadas en las concentraciones de proteínas de choque térmico se calcularon con una prueba t de dos muestras de Welch. Los coeficientes de correlación se calcularon en R.

3.5 Ensayos al estrés por choque térmico

Después de tener el cultivo semilla descrito en el apartado 3.2.1 y cuando la densidad óptica OD_{600} alcanzó un valor entre 0,4 y 0,6, se escaló a mayor volumen en un matraz de vidrio borosilicatado de 1000 mL (Kimax-Kimble N. 25630), se tomó 1 mL del cultivo semilla, se inoculó a 300 mL del medio cultivo 1XTS (Trypton-Sacarosa), y se precalentó por 45 minutos a 76 °C y 120 rpm en incubadora con agitación (IST-4075 Lab Companion JeioTech). Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado.

Cuando la densidad óptica OD_{600} de los cultivos escalados en los matraces de 1000 mL estuvo entre 0,4 y 0,6 se procedió a distribuir todos los medios en dos matraces para hacer homogéneo todo el cultivo con el mismo $OD_{600} = \sim 0,4$. Posteriormente, el medio se distribuyó \sim en tubos de ensayo de vidrio de borosilicato (20x300mm Fisherbrand) en volumen de 30 mL. Este procedimiento se llevó a cabo en campo estéril cerca a flama constante. Los tubos de ensayo se retornaron a la incubadora con agitación (IST-4075 Lab Companion JeioTech) a 76 °C y a 120 rpm por 30 minutos para volver a estabilizar previo al ensayo de choque térmico.

Durante el tiempo de estabilización de los tubos de ensayo, se procedió a programar el baño de agua con variación de temperatura “Waterbath” IsoTemp 210 Thermo Fisher a 80 °C. Cuando se alcanzó esta temperatura, se trasladaron tres tubos de ensayo directamente al baño de agua y, de acuerdo con el tiempo asignado (Tabla 2) para el choque térmico, se retiraron y el contenido del medio se transvasó inmediatamente a un tubo falcon de polipropileno de 50 mL (Fisherbrand Ref. 05-539-8, Fisher Scientific) y se ubicó en una cubeta de hielo hasta iniciar el proceso de centrifugación.

Volumen por tubo (mL)	Temperatura Tratamiento de choque térmico (°C)	Tiempo del choque térmico(°C)			Referencia
		15	30	60	
50	76	15	30	60	(Kagawa et al., 1995; Trent et al., 2003; Yaoi et al., 1998).
50	80	15	30	60	(Chaston et al., 2016; Macario y Macario, 1994; Kagawa et al., 1995; Lemmens et al., 2018; Trent et al., 2003).
50	85	15	30	60	(Macario y Macario, 1994; Kagawa et al., 1995; Trent et al., 2003; Yaoi et al., 1998).
50	90	15	30	60	(Macario y Macario, 1994; Kagawa et al., 1995; Trent et al., 2003; Yaoi et al., 1998).

Tabla 2. Tratamiento de choque térmico. En todos los experimentos, incluyendo la infección por SSV8, la temperatura del cultivo de control se estableció en 76 °C. La temperatura de los choques térmicos se estandarizó de acuerdo con lo reportado en la literatura, al igual que los tiempos mínimos y máximos para la duración del estrés.

3.6 Ensayos al estrés por infección con virus SSV8

El cultivo semilla inició en medio del cultivo 1XTS (Trypton-Sacarosa), y el escalamiento a mayor volumen de 300 mL de igual medio en matraces de 1000 mL de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.2.1. Cuando la densidad óptica OD₆₀₀ alcanzó un valor de ~ 0,15 en cada matraz de 1000 mL, se procedió a mezclar el contenido de los tres matraces en un solo recipiente y se llevó de nuevo a la incubadora con agitación (IST-4075 Lab Companion JeioTech) a 76 °C y 120 rpm para estabilizarse y unificar la densidad óptica por 45 minutos.

El cultivo unificado se distribuyó a volumen de 100 mL en 16 matraces de 250 mL, en ambiente estéril a flama constante (Tabla 3). Cada matraz se inoculó con 20 µL de solución del virus SSV8 con una concentración de $5,44 \times 10^7$ PFU/ML, y se colocaron en la incubadora a 76 °C y 120 rpm, tal como se muestra en la Figura 16.



Figura 16. Cultivos de *Sulfolobus solfataricus* P2 infectados con SSV8. Los matraces se cubrieron con una barrera plástica para disminuir la evaporación. La toma de la densidad óptica se realizó a intervalos de 3 minutos de reposo para disminuir el impacto por apertura de la incubadora. Para mantener el nivel de medio del cultivo en 100 mL, se repuso el volumen tomado para la medición del OD₆₀₀ con igual cantidad de medio estéril no infectado tanto para las muestras control como para los matraces infectados (matraz cinta naranja en la imagen).

Temperatura del cultivo (°C)	Volumen por matraz, control no infectado (mL)	Volumen por matraz a infectar (mL)	Volumen de solución SSV8 (µL)	Tiempo post infección (horas)			
				24	48	72	96
76 °C	100	100	20	24	48	72	96
	100	100		24	48	72	96
	100	100		24	48	72	96
	100	100		24	48	72	96

Tabla 3. Tratamientos de infección de *Sulfolobus solfataricus* P2 por SSV8. La inoculación con SSV8 se agregó a 100 mL en cada matraz en un lapso de un minuto en área con flama cerca a la boca del matraz para evitar potenciales contaminaciones. La densidad óptica OD₆₀₀ se calculó cada 4 horas en cada uno de los matraces de los cultivos de control e infectados, y los datos fueron consignados en formato Excel para su posterior procesamiento.

Cada 24 horas se retiró un matraz con cultivo de control y un matraz con cultivo infectado, y el contenido del medio se transvasó inmediatamente a tubos falcon de polipropileno de 50 mL (Fisherbrand Ref. 05-539-8, Fisher Scientific) y se pusieron en una cubeta de hielo hasta iniciar el proceso de centrifugación. Los otros 50 mL de cultivo se centrifugaron a 3800 rpm, se conservó sobrenadante y el *pellet* se resuspendió con 1,5 mL RNAlater™ (Stabilization Solution Thermofisher), el cual se colocó a temperatura de 4 °C hasta su uso para el trabajo de extracción de RNA. Este proceso se realizó por triplicado en experimentos independientes.

3.7 Extracción de proteínas

Para cada uno de los diferentes experimentos, como se explicó anteriormente, se trabajó con un volumen específico: 50 mL para choque térmico y 50 mL para infección de *Sulfolobus solfataricus* P2 S437 con el virus SSV8. De esa manera, se procedió a realizar la extracción de proteínas llevando a cabo los siguientes pasos:

3.7.1 Centrifugación

Los tubos falcon de polipropileno de 50 mL (Fisherbrand Ref. 05-539-8, Fisher Scientific) se centrifugaron a 3800 rpm (Centrifuga Sorvall RT600D con rotor de ángulo) por 30 minutos con una temperatura de 4 °C. Se descartó el sobrenadante para el experimento del choque térmico y se conservó el sobrenadante en experimento de infección por virus. Por otra parte, el *pellet* o masa de células se colocó en una cubeta de hielo por dos horas y, posteriormente, se resuspendió en 6 mL de 50 mM de HCl-Tris y se guardó a 4 °C hasta su uso.

3.7.2 Suspensión y lisis celular

El sedimento resuspendido en solución obtenido se mantuvo en una cubeta con gel frío, se agregaron 25µL de *cocktail* inhibidor de proteasa (Sigma Aldrich P2714) para prevenir la degradación de las proteínas después de la lisis. El contenido de células en resuspensión se sometió a sonicación (Sonicator Ultrasonic FS-300N) en frío y en intervalos de 45 segundos de sonicación por 45 segundos de reposos en frío a una intensidad de 70 %. Esto se repitió ocho veces para un total de 6 minutos de sonicación directa. Posteriormente, la solución obtenida con un volumen de 6 mL se sometió a centrifugación a 3800 rpm por 20 minutos, se descartó el sedimento y se rescató el sobrenadante.

3.7.3 Concentración del lisado

El lisado se concentró con un tubo-filtro para centrifugación de capacidad en volumen de 4 mL (Amicon® Ultra-4Ultracel 30.000 NMW). Se llenó a esta capacidad y se centrifugó a 3600 rpm por 20 minutos a 4 °C de acuerdo con indicaciones del fabricante para la capacidad del tubo. El proceso se repitió hasta obtener 1,5 mL de lisado filtrado.

La solución concentrada se vertió en tubos de polipropileno para microcentrifugación de 1,5 mL de volumen (National Scientific VWR 20172-698), se rotuló y se puso a temperatura de -20 °C.

3.7.4 Purificación de proteínas de choque térmico por tratamiento de calor

El tubo que contenía la solución de lisado concentrada se colocó a baño de agua (P5 baño de agua con recirculación Thermo Haake DC 10) a 92 °C por 30 minutos, dando como resultado la desnaturalización y precipitación de la mayoría de las proteínas no termoestables (Olichon et al., 2007). Al finalizar este proceso, el tubo pasó a centrifugación (Centrifuge MiniSpin 14500 rpm/mL 022620100 Eppendorf) a 14000 rpm por 4 minutos. Por último, se recogió cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta Eppendorf de 200 µL y punta esterilizada de igual volumen y se colocó en un nuevo tubo de polipropileno de 1,5 mL hasta su nuevo uso.

3.7.5 Ensayo de Bradford

Por medio de este ensayo de proteínas se propuso hacer reaccionar la proteína de interés con el reactivo de Bradford y se midió la absorbancia. Esta se pudo hallar con una ecuación de regresión lineal obtenida de una curva de calibración que se formó con un estándar proteico de albúmina de suero bovino (BSA).

3.7.5.1 Preparación de reactivo de Bradford.

Se pesaron 50 mg de colorante Coomassie Blue G-250 y se agregaron a 25 mL de etanol al 95 %. Posteriormente, se añadieron 50 mL de ácido fosfórico al 85 %, se mezcló la solución hasta que el tinte azul se disolviera por completo, y luego se filtró la solución a través de un sistema con bomba de vacío y un sistema de filtro de 0,45 µm (Nalgene™ Thermo Fisher). El reactivo obtenido se colocó a 4 °C hasta su nuevo uso.

3.7.5.2 Preparación de la proteína estándar.

Se preparó una muestra *stock* de BSA de concentración 1mg/mL y se hicieron seis diluciones, tal como se expone en la Tabla 4.

Muestras BSA	1	2	3	4	5	6	7
Cantidad BSA (μg)	0	20	40	60	80	100	200
Volumen <i>stock</i> BSA 1mg/mL(μL)	0	20	40	60	80	100	200
Reactivo Bradford (μL)	950	980	960	940	920	900	800
Volumen final (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Tabla 4. Diluciones para la curva patrón de proteína con BSA.

Las mezclas se depositaron en cubetas separadas y cubiertas con Parafilm® M y se mezclaron invirtiéndolas suavemente. Las cubetas se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por otro lado, se procedió a medir la absorbancia de cada cubeta a 595 nm. De los lisados obtenidos tanto antes como después del tratamiento de calor, se tomaron 50 μl en una cubeta y se agregaron a 950 μL de reactivo Bradford, y se midió la absorbancia de cada cubeta a 595 nm. Los datos obtenidos se consignaron en un archivo de Excel.

3.8 Detección de proteínas

3.8.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

En esta técnica, la mezcla de proteínas hizo una migración en un campo eléctrico a través de los poros de una matriz en gel de poliacrilamida. Todas las proteínas se desnaturalizaron por la acción del β -mercaptoetanol que rompe los enlaces disulfuro, permitiendo que las proteínas adquirieran una estructura lineal. Luego, por la acción del sodium dodecyl sulfate (SDS), todas las proteínas de las muestras adquirieron carga negativa migrando así hacia el polo positivo del dispositivo.

De esta manera, las proteínas quedaron separadas en el gel en función de sus pesos moleculares; por lo tanto, las proteínas de menor peso molecular, en comparación con las de mayor peso, pasaron con mayor facilidad a través de la membrana de tal manera que las proteínas de menor peso molecular pasaron con más facilidad a través de los poros de la membrana.

3.8.2 Preparación del gel

El gel de poliacrilamida se preparó como se indica en la Tabla 5, instalado con el sistema vertical de Biorad Mini-Protean – Tetra Cell (sistema vertical de 8,3x7,4 cm y un grosor de 0,75 mm, 1,0 mm, y 1,5 mm). Cada gel se compuso de un gel concentrador (superior) de aproximadamente 2 cm de longitud que contiene las casillas de carga para las muestras, y un gel separador (inferior) de aproximadamente 6 cm.

Las soluciones y geles utilizados se prepararon con las siguientes cantidades de reactivos (Tablas 6-10):

Gel separador	
Reactivo	Volumen (mL)*
Tris 1,5 M; pH 8,8	2.6
SDS al 10 % (Dodecil sulfato de sodio)	104 (µL)
Acrilamida al 30 %	5
75 % Sacarosa	1.3
H ₂ O destilada	0.890
Persulfato de amonio (APS) al 5 %	100(L)
Temed (Preparado Comercial Sigma Aldrich)	6 (µL)
Volumen total (mL)	10 mL

Tabla 5. Cantidades para preparación de gel separador en SDP-PAGE.

Gel concentrador	
Reactivo	Volumen (mL)*
Tris 0,5 M; pH 6,8	1.25
Acrilamida al 30 %	0.750
H ₂ O destilada	3
Persulfato de amonio (APS) al 5 %	50 (µL)
Temed (Preparado Comercial Sigma Aldrich)	12 (µL)

Tabla 6. Cantidades para preparación de gel concentrador en SDS-PAGE. * (Valores indicados para dos geles).

Solución tampón para las muestras	
Reactivo	Volumen (mL)
Tris HCl 0,5M; pH 6,8	2.5 ml
Glicerol	0.1 ml
SDS al 10 % (Dodecil sulfato de sodio)	1 ml
Azul de Bromofenol, 1 %	0.100 ml
2-mercaptoetanol	0.005 ml
H ₂ O destilada	6.20 ml
	(Hasta completar volumen a 10 ml)

Tabla 7. Cantidades usadas para las soluciones tampón de las muestras para SDS-PAGE.

Tampón de electroforesis 10X Tris-Glicina pH 8,3 (1L)	
Reactivo	Cantidad
Tris base	30 g
Glicina	144g
SDS al 10 % (Dodecil sulfato de sodio)	10g
H ₂ O destilada	800 mL – Luego hasta completar 1000mL
HCl	Ajustar pH a 8,3
Se diluyo a 1X para su uso en el ranque de electroforesis	

Tabla 8. Cantidades usadas para la preparación de la solución del contenedor externo para electroforesis.

Solución de tinción azul de Coomassie (1 L)	
Reactivo	Cantidad
Azul de Coomassie R-250	1g
Ácido acético	100 ml
Metanol	400 ml
H ₂ O destilada	Hasta completar volumen a 1000 mL

Tabla 9. Cantidades de reactivos usados para la preparación de la solución azul de Coomassie para la tinción de los geles.

Solución decolorante de geles (1L)	
Ácido acético	100 ml
Metanol	400 ml
Agua destilada	Hasta completar volumen a 1000mL

Tabla 10. Cantidades usadas para la preparación de la solución decolorante de geles post-electroforesis.

3.8.3 Preparación de las muestras

Se tomaron muestras de entre 500 μ L a 1000 μ L de los tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, los cuales contenían los lisados purificados con el tratamiento de calor a 92 °C durante 30 minutos.



Figura 17. Sedimentos de proteínas. El procedimiento se considera libre de impurezas cuando el pellet es uniforme tanto en color blanco y textura, y no se observan otros componentes que no cumplan el patrón general observado.

Posteriormente, se agregó ácido tricloroacético (TCA) $C_2HCl_3O_2$ para agrupar las proteínas presentes. Estas se agitaron por 3 segundos en un agitador (Vórtex BR-2000 Biorad) y luego pasaron a microcentrifugación (MiniSpin Eppendorf) a 14000 rpm por 5 minutos. Con micropipeta de 200 μ L se retiró cuidadosamente el sobrenadante. Al *pellet* conseguido se le realizó un lavado con 200 μ L acetona fría para retirar los restos posibles de TCA y se centrifugó 14 000 rpm por 3 minutos (Figura 17). Al finalizar este proceso, se retiró la acetona con micropipeta de 200 μ L de manera cuidadosa y sin alterar el *pellet*, se dejó secar y evaporar a temperatura ambiente para eliminar restos de acetona presentes.

A las muestras se les agregó 30 μ L de urea de concentración 8 M para y 10 μ L de solución tampón para muestras 1:3. Finalmente, las muestras se sometieron al P5 (baño de agua con recirculación Thermo Haake DC 10) durante 10 minutos y se centrifugaron a 600 g antes de cargarlas al gel.

3.8.4 Electroforesis

En el carril uno se cargó 2,5 μ L de proteína patrón (Thermo Scientific™ Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250kDa). Los demás carriles 2 al 10, se cargaron 20 μ L de muestra por cada carril en el gel según la distribución en cada experimento de choque térmico y de

infección viral por SSV8. Los geles se sometieron a 200V, 150 mA por 45-60 minutos con solución tampón de electroforesis 1X Tris-Glicina pH 8,3.

3.8.5 Visualización de bandas

Después de que finalizó el proceso de electroforesis, se retiraron los geles del sistema Bio-Rad, evitando que estos se rompieran. Los geles se ubicaron en una caja plástica que contiene azul de Coomassie (ver Tabla 9) por 2 minutos en agitación leve en plataforma de movimiento horizontal (Ultra Rocker-Rocking Platform Bio-Rad). De manera inmediata, el gel se sumergió en solución decolorante por toda la noche o por 6 horas (Tabla 10).

Al pasar el tiempo señalado, la solución decolorante se retiró de la caja y el gel se ubicó en una tabla de superficie blanca. Posteriormente, se hizo una inspección visual preliminar que permitió observar las bandas del patrón proteico y de las bandas a analizar. Luego, el gel se sometió a las tomas fotográficas para identificar las respectivas bandas y su respectivo peso molecular con una curva patrón e identificación en los valores suministrados por el fabricante de la proteína patrón, tal como como visualiza en la Figura 18.

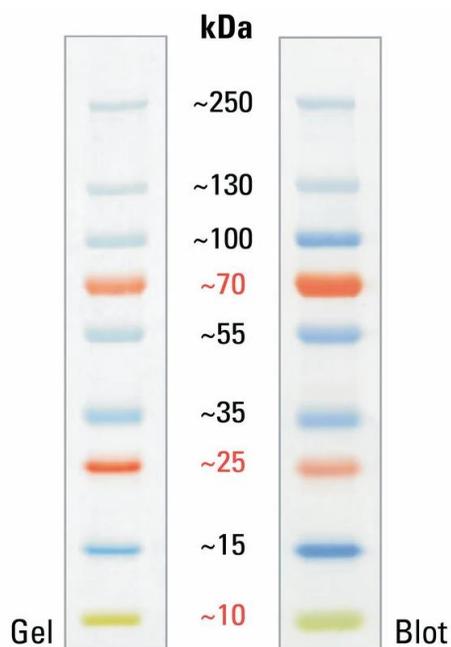


Figura 18. Patrón de corrimiento de proteínas en gel para SDS-PAGE. Las bandas se distribuyeron entre 10 y 250 kDa de peso molecular estandarizado. Esto se obtuvo a través del productor Fisher Company (PageRuler™ Plus Prestained 10-250 kDa Protein Ladder).

3.8.6 *Análisis de geles por ImageJ*

Los geles se convirtieron a 8 *bits* y se analizaron por medio del programa gratuito ImageJ, versión 1.53i. Cada imagen del gel se estandarizó en 1,016 x 607 píxeles equivalentes a 0,1111 píxel/ μm , y se guardó en formato TIFF, el cual contiene la mayor cantidad de información de la imagen original (Villela et al., 2020). Por otra parte, los ajustes de brillo y contraste de cada imagen se realizaron utilizando la función automática del programa ImageJ, el cual sobresatura los píxeles fuera de un rango de escala de grises seleccionado automáticamente.

De acuerdo con el peso molecular expresado en kDa en cada gel, se ubicó el área de interés entre las bandas 70 y 55 kDa, y con la herramienta de selección rectangular se delineó la fila correspondiente a los carriles horizontales de izquierda a derecha. En ese orden de ideas, el procedimiento de análisis fue el siguiente:

- a. Dentro del software de ImageJ, se seleccionaron las ventanas “Analizar”, “Geles”, “Seleccionar el área rectangular de izquierda a derecha del primer carril”, hasta que mostrara “Carril 1 seleccionado” en la barra de estado.
- b. Luego, en “Analizar”, “Geles”, “Trazar carriles para generar los trazados de perfil de cada carril”, los picos más altos del perfil representaron a las bandas más oscuras y los picos más anchos representaron a las bandas que cubren un rango de tamaño más amplio en el gel original.
- c. Con la herramienta de selección de línea recta se trazaron líneas perpendiculares de caída, de tal manera que cada pico correspondiente a cada línea en el gel quedara definido en un área cerrada. Esto último, debido a que en el gel real siempre se encuentran “señales de fondo” o manchas que no llegan al blanco total. Por esto, los picos no llegan hasta la línea de base del gráfico del perfil.
- d. Para cada pico se midió el tamaño de cada área delimitada anteriormente, haciendo clic en el interior del área con la herramienta de varita.
- e. De inmediato, se volvió a “Analizar”, “Geles”, “Etiquetar picos”, para etiquetar cada pico con su tamaño a nivel de área y asignar el porcentaje del tamaño total de los picos medidos.

- f. Finalmente, los valores generados se fueron consignando automáticamente en la ventana “Resultados” generada automáticamente por ImageJ. Estos datos se grabaron para posteriormente analizarlos en Excel.

Con los datos en la hoja de cálculo de Excel, se calculó la densidad relativa de los picos. Estos valores calculados por ImageJ son esencialmente números relativos a la densidad de las áreas seleccionadas. El procedimiento seguido fue expresar la densidad de las bandas seleccionadas en relación con la banda correspondiente a la de 76 °C-Control en el caso de estrés por choque térmico y en el de control a las 24, 48, 72 y 96 horas a 76 °C para la infección viral por SSV8.

3.9 Expresión de RNA para HSP α y HSP β

3.9.1 Aislamiento de RNA

- a. El *pellet* resuspendido en *RNAlater solution* se centrifugó a 8000 rpm en tubo de centrifugación de 1,5 mL por 3 minutos, obteniendo así nuevo *pellet* como se observa en la Figura 19.

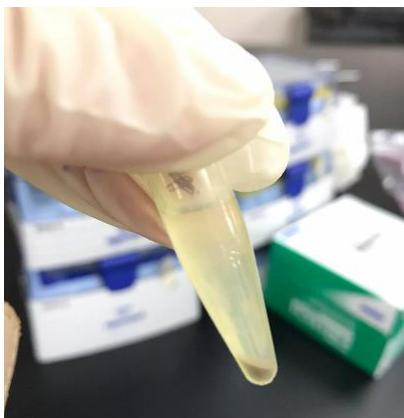


Figura 19. Resuspensión del sedimento de células de *Sulfolobus solfataricus* P2. Después del evento de estrés a las células estas son conservadas en una solución que preserva el RNA por periodos de tiempo de acuerdo con la temperatura, en este caso a 4 °C, conservaba la muestra hasta por tres meses según condiciones del fabricante.

Después de los ensayos de infección con SSV8, las células sulfobales estuvieron en medio de conservación a 4 °C.

- b. Se realizó la extracción del mRNA con el RNeasy Plus Universal Mini Kit, siguiendo las recomendaciones e instrucciones del fabricante. Su posterior presencia se evaluó al añadir Qiazol, tal como se evidencia en la Figura 20.

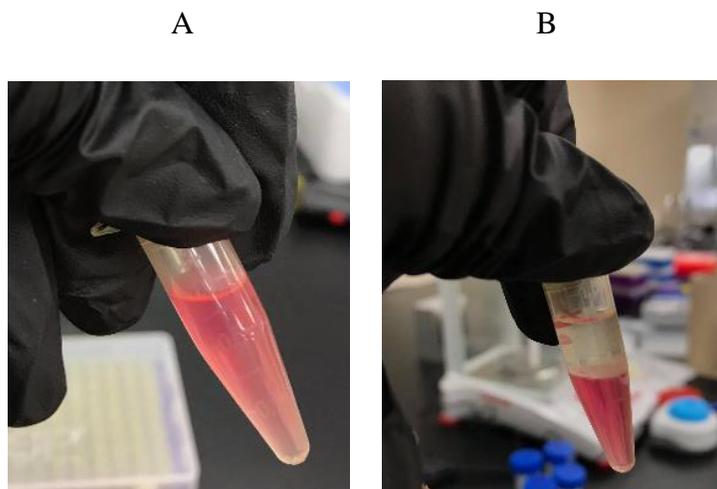


Figura 20. Visualización del RNA. Se añadió la solución de Qiazol (A) y, al separarse las fases, el RNA se hizo visible en la fase de arriba (B).

- c. Luego de extraer el RNA, se utilizó NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) para cuantificar el RNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) y medir los $A_{260}:A_{280}$ para determinar la pureza de las muestras.
- d. Con un gel de agarosa se determinó el estado del RNA.
- e. Posteriormente, se llevó a cabo el tratamiento para eliminar el DNA genómico en la muestra usando el Invitrogen's DNA-free Kit (Life Technologies, Grand Island, NY) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- f. Luego del tratamiento con DNasa, se realizó prueba de PCR normal para establecer si el tratamiento de DNasa fue exitoso.
- g. El PCR se llevó a cabo en una reacción de 25 μL usando 0,5 μL del RNA extraído y tratado con la DNasa.
- h. El PCR contenía: 1X DreamTaq™ PCR Master Mix (10X DreamTaq™ Buffer, 2 μM dNTP Mix y 1,25 U DreamTaq™ Polymerase), 2 μl de cada primer y PCR primer (10 μM).

- i. Las condiciones del PCR fueron: 2 minutos a 95 °C, seguidos por 30 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 55 °C por 15 segundos, y 72 °C por 5 minutos, seguido de 72 °C por 10 minutos.
- j. Para ver el resultado, se tomó 5 µL del PCR producto y se visualizó en un gel de 1,5 % agarosa con 1X SYBR Safe, la cual se corrió a 100 voltios por 25 minutos.
- k. Las muestras se volvieron a medir en el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) para cuantificar el RNA (ng/µL). Se hicieron los cálculos pertinentes para tomar el volumen equivalente a 1 µg (microgramo) de cada muestra y someterla a síntesis de cDNA (*cDNA synthesis reaction*). Para sintetizar el cDNA se utilizó el iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit, usando 1 µg de RNA purificado.
- l. Para cuantificar genes por qPCR se usó el método *absolute quantification*, empleando estándares (concentraciones conocidas) para determinar el número de copias del gen de interés, donde se establecieron regiones más amplias a la región de los cebadores de qPCR.
- m. Para generar los estándares, se hizo PCR usando DNA genómico de *Sulfolobus solfataricus* P2. Las condiciones del PCR fueron: 2 minutos a 95 °C, seguidos por 30 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 55 °C por 15 segundos, y 72 °C por 5 minutos, seguidos por 72 °C por 10 minutos. Para ver el resultado, se tomó 5 µL del PCR producto y se visualizó en un gel de 1,5 % agarosa con 1X SYBR Safe, la cual se corrió a 100 voltios por 25 minutos.
- n. Posteriormente, los productos positivos se purificaron con el QIAquick PCR Purification Kit, y se cuantificaron (ng/µL) con el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). Para convertir las concentraciones (en ng) que proporciona el NanoDrop, un número de moléculas de DNA, se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias (moléculas)} = X \text{ ng} * 6.0221 \times 10^{23} \text{ moléculas /mole} / (N * 660 \text{ g/mole}) * 1 \times 10^9 \text{ ng/g.}$$

X: cantidad de amplicón ng; N: distancia de dsDNA del amplicón: 660g/mole: promedio de masa de 1 par de bases de dsDNA).

- o. A los productos purificados se les realizó diluciones seriadas (1/10) para lograr la curva de calibración (de los estándares). Se realizaron diluciones así: 10^8 a 10^1 copias/ μ l.
- p. Para los qPCR se utilizó 100 ng de cada cDNA en cada reacción.

El diseño de los *primers* o cebadores se llevó a cabo aplicando el siguiente proceso:

El gen *Thermosoma alpha* (*thsA*), que codifica la subunidad alfa del factor termofílico 55 (TF55) en *Sulfolobus solfataricus* P2, se evidencia en la Figura 21. Las regiones a las que se dirigen los cebadores se encuentran señaladas en diferentes colores, así:

```

ATGGCAGCTCCAGTCTTATTGCTTAAAGAGGGAACAAGCAGAACTACTGGAAGAGATGCGCTAAGGA
ATAATATACTTGCTGCGAAGACATTAGCTGAAATGTTAAGGAGTAGTTTAGGTCCTAAAGGCTTGAT
AAAATGCTAATTGATAGCTTCGGTGACGTAACCATAACTAATGATGGTGCTACAATAGTAAAGGATAT
GGAGATTACAGCATCCAGCTGCGAAATTATTAGTAGAAGCAGCTAAAGCTCAAGATGCTGAAGTAGGT
GATGGTACTACAAGTGCTGTAGTATTGGCTGGTGCTCTATTAGAGAAGGCTGAAAGTTTATTGGATCA
AAATATACATCCTACAATAATTATTGAGGGGTATAAGAAGGCATACAACAAGGCCTTAGAGTTACTTC
CGCAGTTAGGAACTAGAATTGATATAAAGGATTTGAATCTTCAGTAGCTAGAGATACTCTAAGAAAG
ATAGCATTACTACTTTAGCAAGTAAGTTTATTGCAGAAGGTGCTGAATTAATAAATAAATTGACAT
GGTAATAGATGCAATAGTTAATGTAGCAGAACCTTTACCTAATGGTGGATATAATGTGAGTTAGACT
TAATAAAGATAGATAAGAAGAAAGGCGGAAGTATAGAGGATAGTGTACTAGTTAAAGGACTAGTGTT
AGATAAGGAGGTAGTACATCCTGGAATGCCTAGAAGAGTCACCAAGGCTAAGATAGCTGTTTTGGAT
GCAGCATTAGAGGTAGAGAAGCCTGAAATTTAGCCAAGATAAGCATCACATCACCTGAGCAAATT
AAGGCTTTCTTGATGAGGAGTCTAAATACCTTAAGGATATGGTTGATAAGTTAGCATCAATAGGTGC
TAATGTTGTAATATGCCAGAAGGGTATTGATGATATAGCACAGCATTCTTAGCCAAGAAAGGGATAT
TGGCTGTAAGAAGAGTTAAGAGGAGCGATATAGAAAAATTAGAGAAGGCATTAGGTGCAAGAATAAT
AAGTAGCATAAAGATGCTACTCCCGAAGACTTAGGATATGCTGAATTAGTTGAGGAAAGGAGAGTTG
GGAACGATAAAAATGGTATTTATAGAGGGTGCTAAGAACTTGAAAGCTGTGAATATCTTGTTAAGAGGT
TCAAATGATATGGCATTAGATGAGGCTGAGAGGAGTATAAATGATGCATTGCATGCTCTAAGGAACAT
ATTATTAGAGCCAGTAATATTACCAGGCGGTGGTGCTATCGAGTTAGAGTTAGCGATGAAATTAAGAG
AGTATGCTAGAAGTGTGGGAGGTAAGGAGCAATTAGCTATAGAAGCATTTCAGACGCATTAGAGG
AGATACCTTTAATTTAGCTGAAACTGCAGGGCTAGAGGCTATACTTCATTGATGGACTTAAGAGCT
AGGCACGCTAAGGGCTTGAGTAATACTGGTGATAGATGTCATAGGCGGGAAGATTGTAGATGATGTA
TATGCGTTAAACATTATCGAGCCTATTAGAGTAAAGTCTCAAGTGTTAAAGAGTGCTACAGAGGCAGC
CACAGCAATATAAAGATTGATGATCTAATAGCGGCTGCCCACTAAAGAGTGAGAAGAAAGGAGGA
GAAGGAAGTAAAGAAGAAAGTGGTGGAGAGGGAGGATCTACTCCATCTTAGGAGACTAA

```

Figura 21. Gen *Thermosoma alpha* (*thsA*). Secuencia AE006641.1_cds_AAK41152.1_1 Chaperonina subunidad Alfa tomada del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). El color verde corresponde al cebador “Forward” externo, el color rojo al cebador “Reverse” externo, el color azul al cebador qPCR “Forward”, y el color amarillo al cebador “Reverse” qPCR. [locus_tag=SSO0862]. Location=complement (736622.738301)].

Por otra parte, el gen *Thermosoma beta* (*thsB*), que codifica la subunidad beta del Termosoma factor termofílico 55 (TF55) en *Sulfolobus solfataricus* P2, se expone en la Figura 22. Las regiones a las que se dirigen los cebadores se encuentran señaladas en diferentes colores, así:

```

GTGCGTAAAATGGCAACAGCTACAGTTGCAACTACACCCGAAGGTATACCTGTAATTATTTAAAAAGA
AGGATCAAGTAGAACATATGGAAAAGAGGCTTTAAGGGCTAATATTGCTGCAGTGAAGGCAATTGAA
GAGGCGCTGAAAAGTACATATGGTCCACGCGGAATGGATAAGATGCTTGTGATAGCTTAGGAGATAT
TACAATAACAAATGATGGAGCAACTATTCTTGATAAAATGGATTTACAACACCCAACGGGTAAACTTT
TAGTTCAGATAGCTAAGGGACAAGACGAGGAAACAGCTGATGGTACTAAAACCTGCTGTAATTCTAGCT
GGAGAATTAGCTAAAAGGCAGAAGATCTCTTATAAAGGAGATTCATCCCACAATAATTGTTAGTGG
ATATAAGAAGGCAGAAGAAATTGCGCTAAAGACTATCCAAGAGATAGCACACCAGTCACTATAAAT
GACTGATGTACTTAGGAAAGTGGCACTCACATCATTAGGCAGCAAAGCGGTAGCAGGTGCCCGAG
AGTATTTAGCTGACCTTGTAGTTAAAGCAGTAGCGCAAGTAGCTGAATTAAGGGGTGATAAGTGGTAC
GTTGATCTAGATAATGTACAAATAGTTAAGAAACATGGTGGTAGTGTAAATGATACTCAATTAGTATA
TGGTATAGTAGTAGATAAGGAAGTTGTACATCCTGGTATGCCAAAGAGGATCGAAAACGCTAAGATA
GCACTTTTAGACGCTTCATTAGAAGTTGAGAAACCAGAATTAGATGCGGAGATAAGGATTAACGATCC
AACACAAATGCACAAATTCTAGAAGAAGAAGAAAATATACTGAAAGAAAAGGTAGATAAGATIGC
AGCTACTGGTGCTAACGTTGTAATATGTCAGAAAGGTATTGATGAAGTTGCACAACACTATCTAGCT
AAGAAAGGTATACTAGCAGTTAGAAGAGCTAAGAAGAGCGATTTAGAAAAATTAGCCAGAGCTACTG
GAGGAAGAGTTATATCAAATATTGACGAATTGACTTCGCAAGACCTAGGCTACGCTGCATTAGTAGAG
GAGAGAAAAGTAGGAGAGGATAAGATGGTTTTTCGTAGAAGGTGCAAAGAATCCAAAATCCGTTAGCA
TACTAATAAGAGGGCGGATTGGAAAGAGTAGTTGATGAAACGGAAAGAGCTCTGAGGGATGCTTTAGG
TACTGTAGCTGATGTAATAAGAGATGGTAGAGCTGTAGCTGGTGGTGGAGCTGTAGAGATAGAGATA
GCTAAGAGATTGAGGAAGTATGCTCCTCAAGTTGGTGGTAAAGAGCAATTAGCTATTGAAGCCTATGC
TAACGCAATTGAGGGTCTTATAATGATATTAGCTGAAAATGCAGGATTAGACCCTATAGACAAATTGA
TGCAATTAAGAAGTCTTCATGAGAATGAGACTAATAAATGGTACGGACTTAATTTATTCACTGGAAAT
CCAGAAGATATGTGGAATTGGCGTTATTGAACCAGCATTAGTTAAAATGAATGCAGTTAAAGCT
GCAACAGAAGCGGTGACATTAGTGCTAAGAATAGATGATATTGTAGCAGCTGGGAAGAAGAGTGGGA
AGCGAGCCAGCGGTAAGAAAGAAAAAGATAAAGAAGAAAAATCTTCTGAAGACTAA

```

Figura 22. Gen *Thermosoma beta* (*thsB*). Secuencia |AE006641.1_cds_AAK40620.1_1 Chaperonina subunidad Beta tomada de NCBI. El color verde corresponde al cebador “Forward” externo, el color rojo al cebador “Reverse” externo, el color azul al cebador qPCR “Forward”, el color amarillo al cebador “Reverse” qPCR. [locus_tag=SSO0282]. [Location=complement 239345.241018].

Los cebadores dirigidos al gen *Housekeeping* (*tfIID*), que codifica la proteína de unión para la RNA polimerasa y la transcripción (caja TATA) en *Sulfolobus solfataricus* P2, se identifican en la Figura 23. Las regiones a las que se dirigen los cebadores se encuentran señaladas en colores, así:

TCTAACTCTTCCTCTTCCTCTATAGGTTTTACGCAATCTAATTCTGCTAACTTATCAAATATCCTCTTTA
 CTGCTTTAGACACTTCATCTTCTCTCTTCGCTCCAGTTATTACCATTTTACCAGTCTGAAAATTAGC
 AGGACAACCTAGGATCATCCATTCTGAAAATTAGTCTGGGAATTGTTCTGGTTCGTACATGTTATTT
 TCCAATAGGAATGCAGCTTTATCTAGATTAACGTTACATGTAAGTTAGCTGATGCAACTATATTTTGG
 ATTTGGATTTTAGGCTTGCCCACTATTTTATGCCATATTTTTTAAGCGTTTTTATTATCCTTTTTACAGC
 CTTTATTAGCTCCTCTGTACTTTTTGCACCTGTTACTACCATTTTACCAGATTTGAATATCAAAGCTGTT
ACCTTAGGCTGTTCTAATCTAAATATTAGTCCCAGGAATTGATCTGGATCGTATTCTATGTTGGGGAT
ACTTCTTTCCATAGCGTATAAATCTAAACTCTGCTCTAACGTAAGTGTGCCACAATATTTTCTATA
 TTTACAATGGGTTTATACG

Figura 23. Regiones de dirección de los cebadores. Secuencia tomada del genoma completo de *Sulfolobus solfataricus* P2 (AE006641.1:806995-807565) tomado de NCBI. El color verde corresponde al cebador “Forward” externo, el color rojo al cebador “Reverse” externo, el color azul al cebador qPCR “Forward”, y el color amarillo al cebador “Reverse” qPCR.

Los cebadores para el direccionamiento del gen *vp1*, que codifica la proteína de la cápside viral estructural en SSV8, se observan en la Figura 24. Las regiones a las que se dirigen los cebadores se encuentran señaladas en colores, así:

TGACTTATAACGCGAATGAGATAAGGGCAAAAATCCTAAGAAAGAAGATACTGGAGCTTATCGCTGA
 AAACCTACGTACTCTCTGCGTCGCTAATCTCTCACACACTGCTTTTTGAGCTATGCCACCGTTTTGCGTCAT
 CTCAGGATCCTAAATGAACACGGCTATATCGAATTGTACAAAGAAGGGCGAACGTTATACGCCAAAA
 TTAAAGAGAACTCTAAACAAATTCAGATTCTGAATTCAGAACTGGAGGGGTTTAAAAAGCTTAACGAA
AAGACCTTAGTGACCGAGAATGAGGGCAGTCGCGGTATTGTCAGCACCAAAGAACTAAGAAGGGC
TGAGGCAACTAACATAGGTGTACTGTTAGGGTTATTCATCTTCATACTTATAGGAATAGTGCTATTGC
CCGTTATIGTTTCACAAGTAAACAACCTCACGAGTGGTACCGCACCAGCAGTTACGGTACTAATGC
 TACATTATTGAACTTGGTACCGCTATTCTATATACTTGTGTTAATAATCGTTCGCGGGTAGTGGCGT
 ATAAAAATCTACAAAGATTGAGGGGTTGAAAGATGGAGTCAAATGTTAAGGCAGTAATTTTTTTGTTA
 TCTTTATCCTCATCGGGTTGTCCTATTCCAACCAATTTATAATGAAGTAGTTACGTTACGACATCAG
 GAACCTTACTACTTATACGACTGTAAGCGGTACGCTTACTGAAACGACATCATCGTTTATACCTAAC
CCGCAATAIGTAGGGTCTTCAAACGCTACTGTTGTGTCATTAGTACCGGTCTTCTACTTACTTGTGTT
 GATAATAGTACCGGCCGTGATTGGTTACAGATTGTACAAGAGTGAGTAG

Figura 24. Cebadores para gen *vp1*-SSV8. Cebadores para el gen *vp1*-SSV8, cuya secuencia se tomó del genoma de *vp1* NP_963961.1, a través del NCBI. El color verde corresponde al cebador “Forward” externo, el color rojo al cebador “Reverse” externo, el color azul al cebador qPCR “Forward”, en negrilla se encuentra el cebador “Reverse” qPCR, y el gen *vp1* se muestra en gris.

3.9.2 qPCR

La mezcla de reacción para qPCR contenía mezcla maestra SYBR Green concentrada dos veces (Applied Biosystems, Foster City, CA), sonda 300 nM y 300 nM de cada cebador, combinado en agua estéril libre de nucleasas (Invitrogen) antes de la adición de la plantilla de DNAc. Los cebadores específicos para cada reacción se especifican en la Tabla 11.

Las condiciones de qPCR fueron las siguientes:

- 95 °C, 40 ciclos de 15 sa 95 °C y 1 min a 60 °C, seguido de un análisis de la curva de fusión.
- El PCR se hizo en una reacción de 25 µL usando 0,5 µL del RNA extraído y tratado con la DNAasa.
- El PCR contenía: 1X Dream Taq™ PCR Master Mix (10X Dream Taq™ buffer, 2 µM dNTP Mix y 1,25 U Dream Taq™ Polymerase), 2 µl para cada PCR primer (10 µM).
- Las condiciones del PCR fueron: 2 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 55 °C por 15 segundos, y 72 °C por 5 minutos, seguido por 72 °C por 10 minutos.
- Para ver el resultado, se tomó 5 µL del producto PCR y se visualizó en un gel de 1,5 % de agarosa con 1X SYBR Safe, la cual se corrió a 100 voltios por 25 minutos.

Nombre del cebador o <i>primer</i>	Primer objetivo (gene/producto)	Secuencia del primer (5'-3')	Tm °C	Amplicón Tamaño (bp)	Propósito
AlphaExtFWD	<i>thsA</i> Thermosoma Subunidad Alfa (thermophilic factor 56)	GGATGCAGCATTAGAGGTAGAG	62	888	Generar las plantillas estándar de qPCR.
AlphaExtRev		CTTCCTTCTCCTCCTTTCTTCTC	62		
qPCRAAlphaREV		CTACAATCTCCCCGCTATGAC	62		
qPCRAAlphaFWD		GCAGACGCATTAGAGGAGATAC	62	142	Cuantificación de transcripción de copias en la expresión en experimentos de qPCR.
BetaExtFWD	<i>thsB</i> Thermosoma Subunidad Beta	TGCAGCTACTGGTGCTAAC	62	749	Usado con el cebador qPCRExtBetaREV para generar plantillas estándar

	(thermophilic factor 55)				qPCR.xxxxxxxxxx.
qPCRBetaFWD		GGCGTTATTGAACCAGCATTAG	62	118	Cuantificación de transcripción de copias en la expresión en experimentos de qPCR.
qPCRExtBetaREV	GCTCGCTTCCACTCTTCTT	62			
HouseEXtFWD	<i>tfIID</i> proteína de unión para RNA polimerasa y transcripción (TATA box)	CTTCTCTCTTCGCTCCAGTTATT	62	452	Generar plantillas estándar qPCR.
HouseExtRev		TGTGGCAACAGTTACGTTAGA	62		
HouseqPCRfWD		GCTGTTACCTTAGGCTGTTCTA	62	91	Cuantificación de transcripción de copias en la expresión en experimentos de qPCR.
HouseqPCRRev		ACGCTATGGAAAGAAGTATCCC	62		
SSV8ExtFWDVp1	<i>vp1 and small upstream region of vp1</i>	AAAGACCTTAGTGACCGAGAATG	62	492	Generar plantillas estándar qPCR,
SSV8ExtREV		GACCCTACATATTGCGGGTTAG			
SSV8qPCRREVvp1		CTACCGCGGGAACGATTATT			

Tabla 11. Cebadores utilizados en los experimentos de qPCR. Estos cebadores tuvieron como función primaria facilitar la cuantificación de copias de transcripción en la expresión específica de las subunidades HSP α y HSP β en los eventos de estrés por: choque térmico, infección e infección-choque térmico por SSV8 en *Sulfolobus solfataricus* P2.

4 Resultados

4.1 Evaluación de *Sulfolobus solfataricus* P2 en condiciones de estrés térmico

4.1.1 Estrés por choque térmico para *Sulfolobus solfataricus* P2

Las células de *Sulfolobus solfataricus* P2 se cultivaron hasta la fase media exponencial a 76 °C cuando el OD₆₀₀ de los medios estuvo alrededor de ~ 0,4 (3×10^8 células/mL). Por otro lado, tres matraces (réplicas) pasaron a choque térmico a 80 °C, 85 °C y 90 °C en baño de agua (*waterbath*) *Isotemp 210 Thermo Fisher*, y los otros tres cultivos de control se dejaron en incubadora con agitación (*IST-4075 Lab Companion JeioTech*) a 76 °C a 120 rpm por 192 horas. Así, el crecimiento celular se controló con mediciones espectrofotométricas de la densidad óptica OD₆₀₀ cada cuatro horas.

4.1.2 Crecimiento bajo choque térmico a 80 °C

La exposición de los cultivos al choque térmico y de control a 80 °C inició en la fase de crecimiento exponencial alrededor de las 72 horas con OD₆₀₀ ≈ 0,4. De este modo, hasta la hora 88 mostraron un crecimiento en promedio similar para el control y las células sometidas a choque térmico (Figura 25). Por su parte, entre la hora 88 hasta la 96 de la fase exponencial final, los cultivos sometidos al choque térmico presentaron un leve incremento promedio en el OD₆₀₀ de 0,09 ($6,75 \times 10^7$ células/mL).

Asimismo, la fase estacionaria se alcanzó a partir de la hora 100 hasta la hora 120, cuando los cultivos, en promedio, obtuvieron entre OD₆₀₀ = 1,45 ($1,087 \times 10^9$ células/mL) y OD₆₀₀ = 1,51 ($1,13 \times 10^9$ células/mL). En esta fase, los cultivos sometidos al choque térmico tuvieron una diferencia de disminución en el OD₆₀₀ = 0,04 ($3,25 \times 10^7$ células/mL).

Para la fase de muerte celular, se presentó una diferencia en el OD₆₀₀ = 0,07 ($5,25 \times 10^7$ células/mL) del cultivo en medio del choque térmico sobre el control asilado después de la hora 120. El cultivo de *Sulfolobus solfataricus* P2 sometido a estrés térmico de 80 °C no provocó una respuesta o inhibición sustancial en el crecimiento celular, y las diferencias mostradas en las fases exponencial, latencia y muerte fueron bajas y cercanas a las presentadas por los controles no sometidos a estrés.

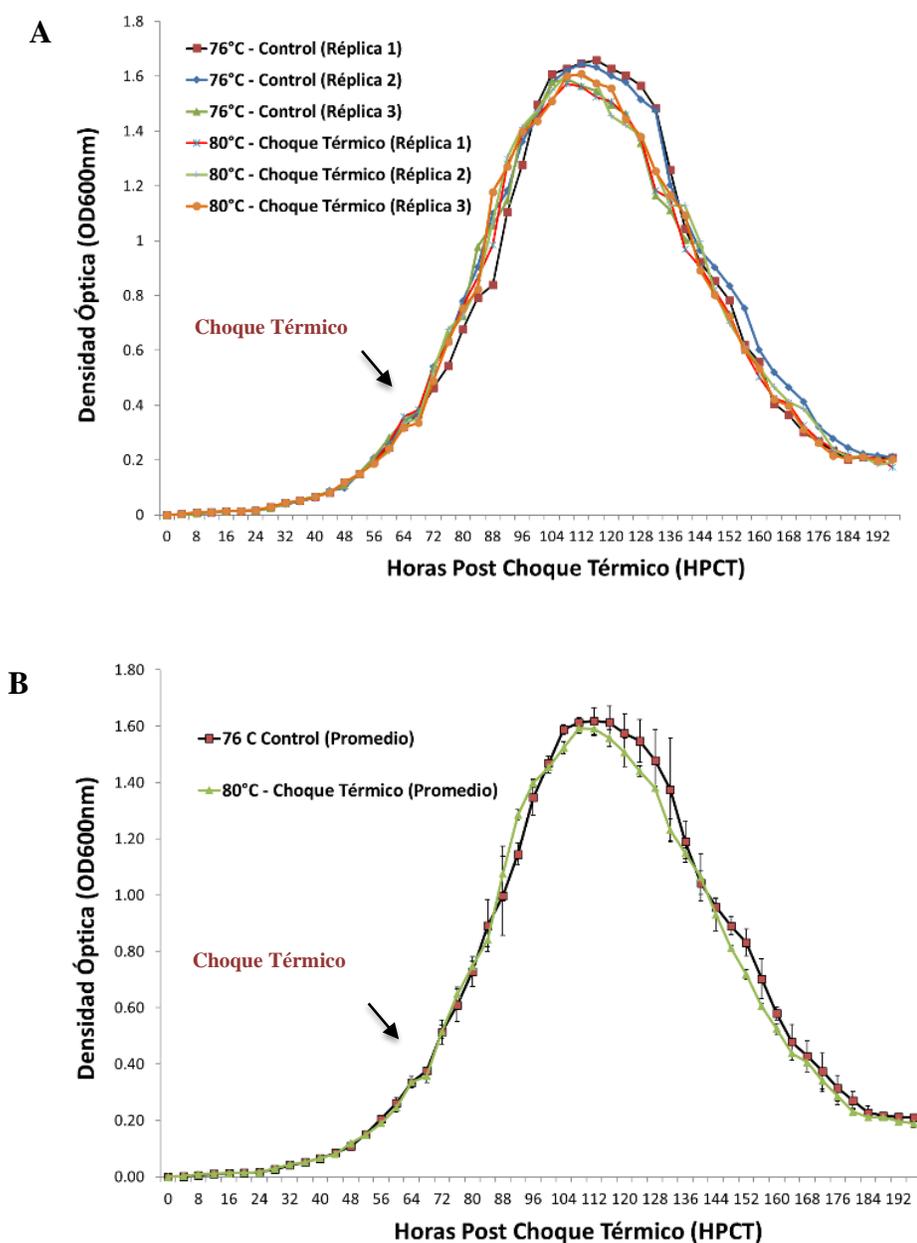


Figura 25. Curva de crecimiento de *Sulfolobus solfataricus* P2 en choque térmico a 80 °C. Se expone el cultivo en medio Tripton-Sacarosa 1XTS pH: 3.15 (A), y el choque térmico a 80 °C con control a 76° C, tres réplicas de cada muestra y OD₆₀₀ cada cuatro horas (B). Los valores OD₆₀₀ son promedios de los triplicados del control a 76 °C y de los cultivos expuestos a choque térmico de 80 °C, la flecha indica el momento del choque térmico OD₆₀₀= 0,4 y, por último, las barras de error representan la desviación estándar; el choque térmico fue aplicado hasta la fase de muerte del crecimiento celular.

4.1.3 Crecimiento bajo choque térmico a 85 °C

En la fase de crecimiento, la exposición de los cultivos al choque térmico a 85 °C inició alrededor de las 72 horas con $OD_{600} \approx 0,4$, así, a partir de la hora 76, se observó un retraso significativo del crecimiento celular (Figura 26).

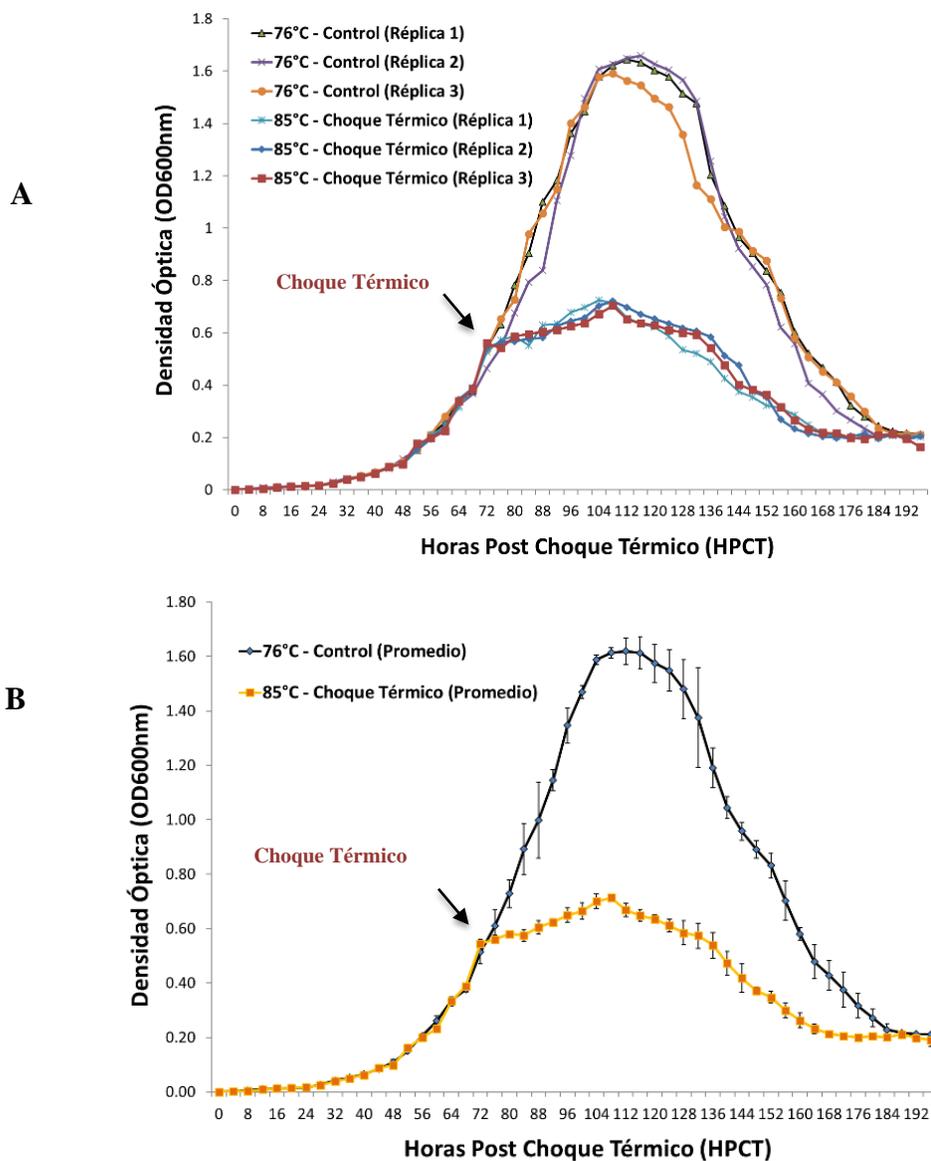


Figura 26. Curva de crecimiento de *Sulfolobus solfataricus* P2 en choque térmico a 85 °C. Cultivo en medio Tripton-Sacarosa 1XTS pH: 3.15 (A), y el choque térmico a 85 °C con control a 76 °C, tres réplicas de cada muestra y OD_{600} cada cuatro horas (B). Los valores OD_{600} son promedios de los triplicados del control a 76 °C y de los cultivos expuestos a choque térmico de 85 °C, la flecha indica el momento del choque térmico $OD_{600} = 0,4$ y, por último, el choque térmico se aplicó hasta la fase de muerte del crecimiento celular; las barras de error representan la desviación estándar.

Por otra parte, los cultivos que recibieron el choque térmico a 85 °C frente al control sin choque térmico a 76 °C se observan en la Figura 26. Igualmente, el crecimiento en los cultivos afectados por choque térmico tuvo una fase exponencial entre la hora 78 a la 102 del sometimiento a estrés a 85 °C, esto con un promedio en $OD_{600} = 0,63$ ($\sim 4,72 \times 10^8$ células/mL) frente a $OD_{600} = 1,15$ ($\sim 8,62 \times 10^8$ células/mL).

La fase estacionaria no fue estable en comparación con el cultivo de control entre las horas 12 y 136 en los cultivos de choque térmico, lo que mostró un descenso continuo en la densidad óptica medida. A partir de la hora 137, se evidenció una disminución continúa considerada como la fase de muerte celular, la que finalizó en la hora ~ 192 al igual que el control a 76 °C en esta última fase.

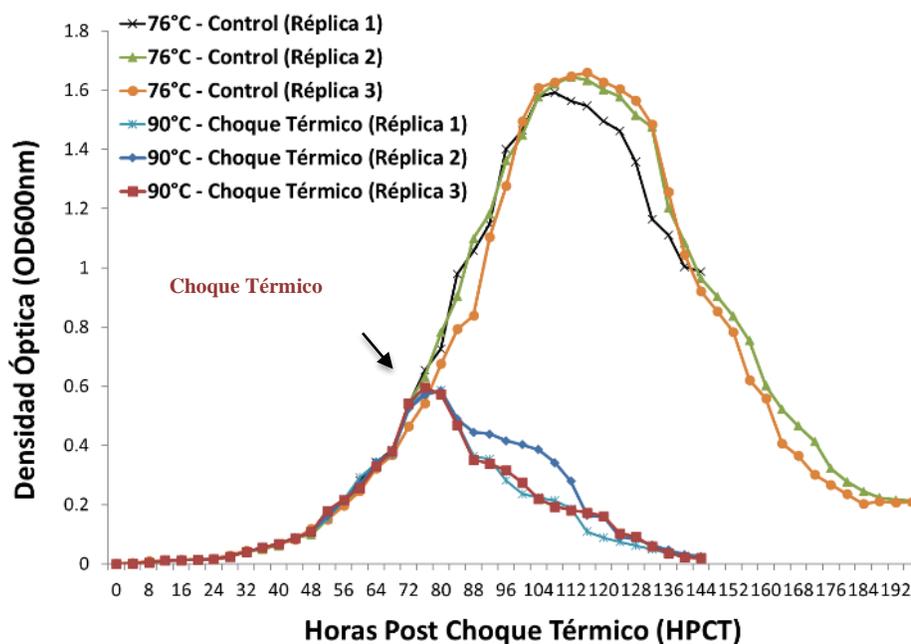
Finalmente, el estrés térmico a 85 °C generó, en la población de *Sulfolobus solfataricus* P2, una respuesta amplia de inhibición prolongada en el crecimiento celular a partir de la hora 72, lo que permitió constatar una diferencia frente al control de 76 °C que fue de más del 50 % en lo que respecta con la densidad óptica reportada.

4.1.4 Crecimiento bajo choque térmico a 90 °C

La exposición al choque térmico a 90 °C inició en la fase de crecimiento exponencial alrededor de las 72 horas con $OD_{600} \approx 0,4$, así, a partir de la hora 73, se observó una afección significativa del crecimiento celular frente al control sin choque térmico a 76 °C, lo que se notó en las réplicas del experimento (Figura 27).

El crecimiento en los cultivos afectados por choque térmico no tuvo una continuación de la fase exponencial y no se evidenció la fase estacionaria, por ello, se entró, de inmediato, en una disminución de la población, lo que inhibió su crecimiento, de manera definitiva, hasta la hora 144, contrario con el control que finalizó a la hora 192. El estrés térmico a 90 °C fue letal para la población de *Sulfolobus solfataricus* P2, esto con una respuesta de inhibición definitiva en el crecimiento celular a partir de la hora 72. Por ejemplo, en la hora ~ 102 , la densidad óptica para los cultivos en choque térmico estaba en $OD_{600} \approx 0,30$ ($2,25 \times 10^8$ células/mL) frente al control con un $OD_{600} \approx 1,47$ ($1,10 \times 10^9$ células/mL).

A



B

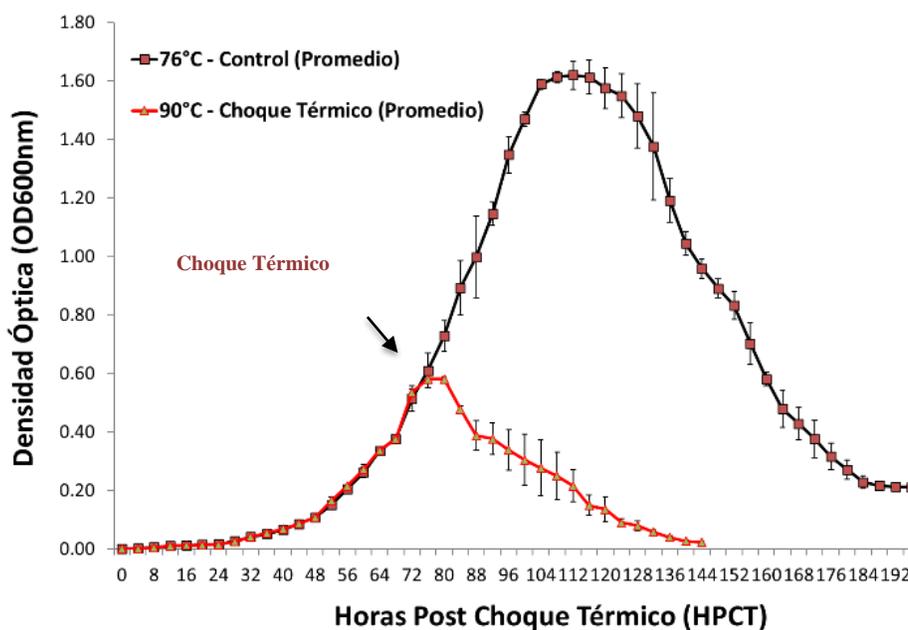


Figura 27. Curva de crecimiento de *Sulfolobus solfataricus* P2 en choque térmico a 90 °C. Cultivo en medio Tripton-Sacarosa 1XTS pH: 3.15 (A), el choque térmico a 90 °C con control a 76 °C, tres réplicas de cada muestra, y la densidad óptica OD₆₀₀ cada cuatro horas (B). Los valores OD₆₀₀ son promedios de los triplicados del control a 76 °C y de los cultivos expuestos a choque térmico de 90 °C, la flecha indica el momento del choque térmico OD₆₀₀= 0,4 y, por último, el choque térmico se aplicó hasta la fase de muerte del crecimiento celular; las barras de error representan la desviación estándar.

4.1.5 Cuantificación de proteínas generadas en estrés por choque térmico

Posterior a la sonicación y la concentración del lisado, la solución obtenida se sometió al ensayo de Bradford, con el fin de determinar la concentración proteica presente en la muestra. Los resultados alcanzados de las réplicas (Tabla 12 y Figura 28) muestran el valor total del contenido de proteínas en el cultivo celular de *Sulfolobus solfataricus* P2 expuesto al estrés térmico.

4.1.5.1 Purificación de lisado y ensayo Bradford.

Las proteínas de hipertermófilos tienen valores de T_m (Temperatura de fusión, donde cerca del 50 % de las proteínas están desnaturalizadas) mucho más altos que las proteínas lábiles al calor; esta diferencia es la que permite que las proteínas de estos organismos mantengan su estructura a temperaturas mucho más altas que las toleradas por las proteínas lábiles al calor (Ahmad et al., 2020).

Para el caso de las proteínas de choque térmico, estas son estables a temperaturas que, para otras, representarían la desnaturalización (Haslbeck y Vierling, 2015). Por lo tanto, la estabilidad térmica también hace que sea factible purificar estas proteínas del resto de las proteínas termolábiles y otros restos celulares que se hallen en el lisado, esto mediante el método de tratamiento térmico (Olichon et al., 2007; Patchett et al., 1989).

La concentración total promedio de proteínas sin purificar obtenida de 50 mL (~ 1,5 x 10¹⁰ células) de cultivo de *Sulfolobus solfataricus* P2 fue de ~366 µg/mL (Tabla 12). Lo anterior se dio al encontrar la más alta concentración con 367,56 µg/mL en el ensayo por estrés térmico a 85 °C-60 minutos, seguida del tratamiento a 85 °C-30 minutos con 366,96 µg/mL y el tratamiento a 90 °C-60 minutos con 366,31 µg/mL; los demás tratamientos estuvieron en un rango entre 352 y 367 µg/mL.

Luego del tratamiento de purificación de proteínas por calor (92 °C-30 minutos), se obtuvieron concentraciones que representaron entre el 12,2 % y 12,8 % del contenido proteico extraído al cultivo sometido a cada uno de los tratamientos de estrés por choque térmico (Tabla 13 y Figura 28).

En todos los tratamientos de choque térmico, el nivel de concentración de proteína fue superior levemente, incluso, a 80 °C-15 minutos y 80 °C-30 minutos, lo que mostró un incremento mayor en relación con los otros dos en 80 °C-60 minutos. Respecto con la mayor concentración de proteína, se mantuvo la misma distribución en los tratamientos 85 °C-60 minutos, 85 °C-30 minutos y 90 °C-60 minutos.

Temperatura/ Tiempo	CT S437, réplica 1 (µg/mL)	CT S437 réplica 2 (µg/mL)	CT S437, réplica 3 (µg/mL)	CT S437, réplica 4 (µg/mL)	Promedio (µg/mL) +/- 0.3	DO (Prom) +/- 0.06	Prom µg /DO
76 °C- Control	387,86	352,66	368,66	352,06	365,31	0,564	647,71
80 °C-15	387,66	353,06	368,46	352,26	365,36	0,559	653,60
80 °C-30	387,86	352,86	368,66	352,26	365,41	0,511	715,09
80 °C-60	388,46	353,46	368,86	352,46	365,81	0,436	839,01
85 °C-15	388,46	354,46	368,46	352,06	365,86	0,452	809,42
85 °C-30	390,26	355,46	369,46	352,66	366,96	0,431	851,42
85 °C-60	390,86	355,86	369,86	353,66	367,56	0,427	860,80
90 °C-15	388,26	352,86	368,26	352,26	365,41	0,511	715,09
90 °C-30	388,86	353,86	369,06	353,06	366,21	0,535	684,50
90 °C-60	388,86	354,06	369,46	352,86	366,31	0,463	791,17

Tabla 12. Concentraciones de proteínas totales. Los lisados concentrados obtenidos en cada experimento se analizaron a través del ensayo de Bradford, con el fin de conocer la concentración de proteína total obtenida de las células estresadas. Los valores más altos de concentración proteica se presentaron en los tratamientos superiores a 80 °C en temperatura y a partir de los 30 minutos en tiempo de sometimiento al estrés. Los valores de la densidad óptica son estables en consideración de que el tiempo del evento estresante no fue letal y no llegó a inhibir el crecimiento de la población; la corrección del promedio de la concentración se realizó con la densidad óptica. +/- Error de la media.

Temperatura/ Tiempo	CT S437, réplica 1 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CT S437, réplica 2 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CT S437, réplica 3 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CT S437, réplica 4 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Promedio ($\mu\text{g}/\text{mL}$) +/- 0.3	Densidad óptica (promedio) +/- 0.06	Prom $\mu\text{g}/\text{DO}$
76 °C- Control	46,06	45,86	46,26	44,46	45,66	0,564	80,96
80 °C-15	46,06	46,06	46,26	44,66	45,76	0,559	81,86
80 °C-30	46,06	46,06	46,46	44,86	45,86	0,511	89,75
80 °C-60	46,46	46,46	46,46	45,46	46,21	0,436	105,99
85 °C-15	46,26	46,26	46,26	45,86	46,16	0,452	102,12
85 °C-30	47,86	46,66	46,66	46,26	46,86	0,431	108,72
85 °C-60	47,66	47,86	47,06	45,66	47,06	0,427	110,21
90 °C-15	46,26	46,26	46,46	44,26	45,81	0,511	89,65
90 °C-30	47,46	46,26	46,66	45,06	46,36	0,535	86,65
90 °C-60	46,46	46,66	46,86	45,46	46,36	0,463	100,13

Tabla 13. Concentración proteínas de choque térmico. Los lisados sometidos a purificación con tratamiento térmico a 90 °C por 30 minutos mantuvieron una mayor concentración de proteínas termoestables en los experimentos de choque térmico a 85 °C por 30 y 60 minutos, y en 90 °C por 30 y 60 minutos. Las concentraciones reportadas post purificación representaron un ~ 12 % de las proteínas totales reportadas en las células estresadas; la corrección del promedio de la concentración se realizó con la densidad óptica. +/- Error de la media.

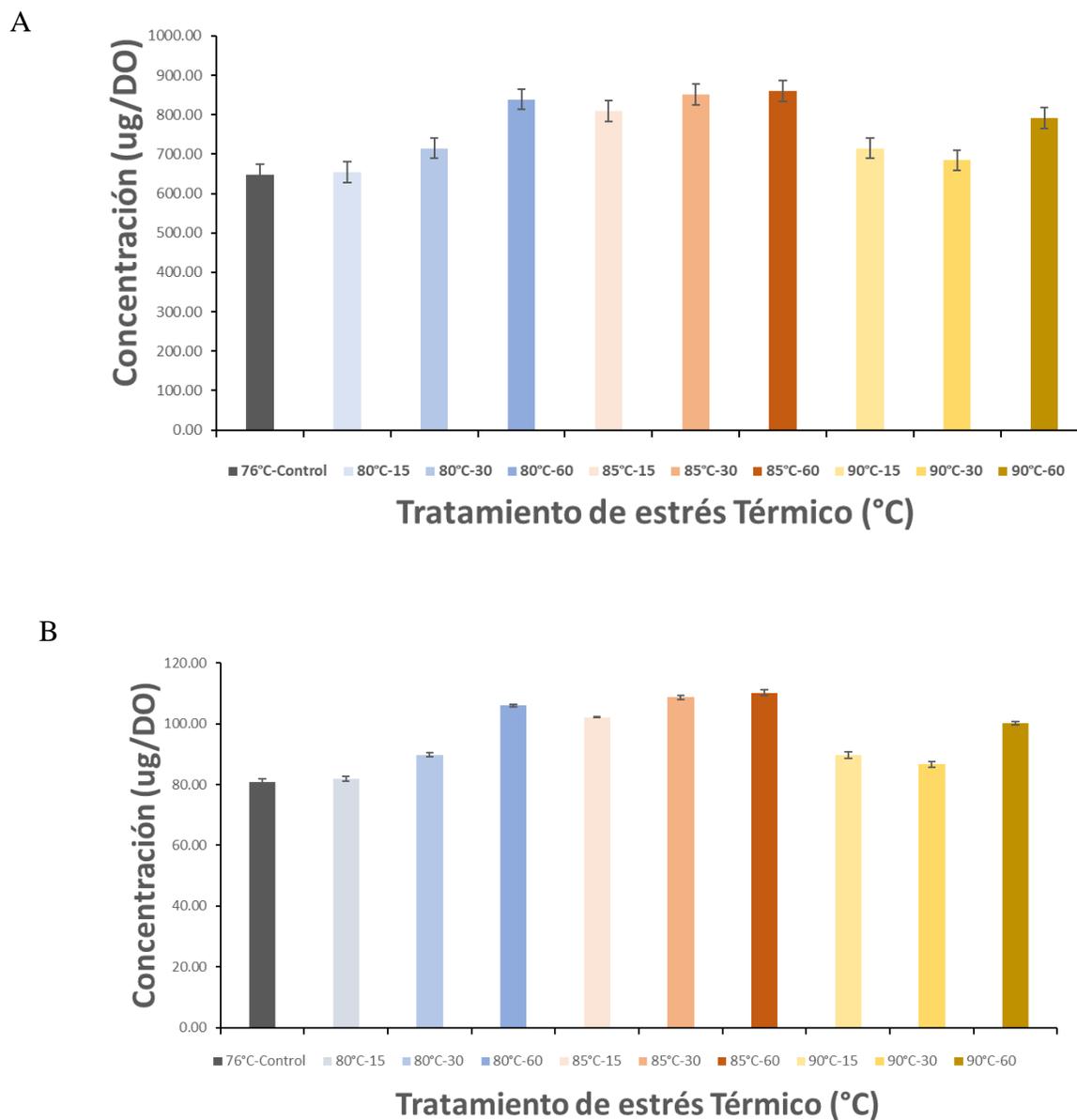


Figura 28. Concentración proteica por ensayo de Bradford para choque térmico. Concentraciones de las proteínas totales de los lisados sin purificar (Figura 28) (A). Para las temperaturas de 85 °C por 30 minutos y 60 minutos, los valores fueron más altos que los demás tratamientos de estrés. Por otra parte, se expone la concentración de proteínas termoestables de las concentraciones obtenidas de los lisados purificados a 92 °C por 30 minutos (Figura 28) (B); las barras de error representan la desviación estándar.

4.1.5.2 Visualización de proteínas de choque térmico en SDS-PAGE.

La separación electroforética se aplicó a los extractos concentrados y los lisados purificados para proteínas de choque térmico, lo que se sometió al procedimiento de SDS-PAGE; en la Figura 29 se muestra la selección de cuatro réplicas independientes de geles obtenidos.

Las proteínas de choque térmico de interés tienen un peso molecular ~60 kDa (Trent et al., 1994; Yaoi et al., 2004). Por otro lado, en los geles se evidenciaron dos bandas correspondientes con HSP α y HSP β , lo que se resalta en la Figura 29, concretamente, en la línea roja.

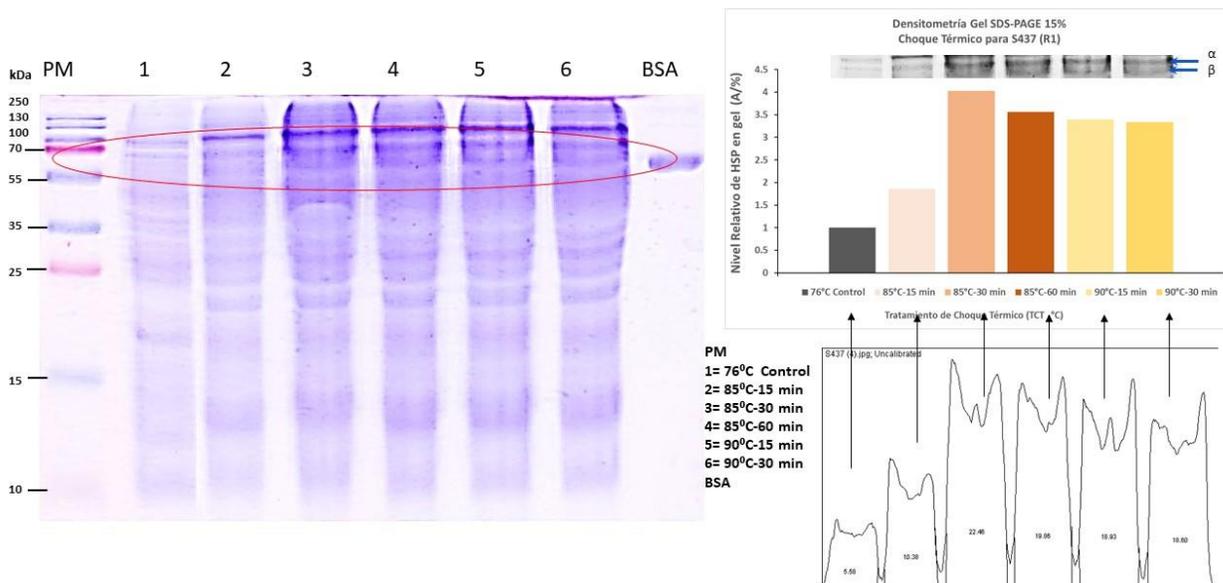
Asimismo, los tratamientos de estrés se realizaron a los cultivos de *Sulfolobus solfataricus* P2 a temperaturas de 85 °C y 90 °C por periodos de 15, 30 y 60 minutos de las muestras provenientes de los tratamientos de purificación, así como por tratamiento de calor a 92 °C por 30 minutos. El tratamiento a 80 °C no se consideró para efectos comparativos, esto en consideración con los bajos niveles de inhibición al crecimiento observados en la curva de crecimiento a esa temperatura.

Con el propósito de identificar y comprobar, en el perfil electroforético, la regulación al alza de las proteínas del choque térmico, se cargaron, en el gel, las muestras sometidas a las temperaturas de 85 °C y 90 °C, y los diferentes periodos con sus respectivos controles a 76 °C. En las diferentes réplicas de geles de poliacrilamida usadas, se hicieron visibles las bandas que, por peso molecular, correspondieron con HSP60, es decir, las ubicadas entre las bandas ~70 y ~55 kDa del patrón proteico y en alineación cercana con el patrón de BSA, cuyo peso molecular es ~66 kDa; además, el desplazamiento de las bandas se estableció por medio de una curva patrón de BSA con concentraciones conocidas.

Por último, el estrés por choque térmico a temperatura de 85 °C reflejó una intensidad mayor en las bandas frente al control sin choque térmico a 76 °C, sin embargo, esta intensidad fue diferente y gradual respecto con el tiempo de estrés al que se sometieron las células de *Sulfolobus* (Figura 29).

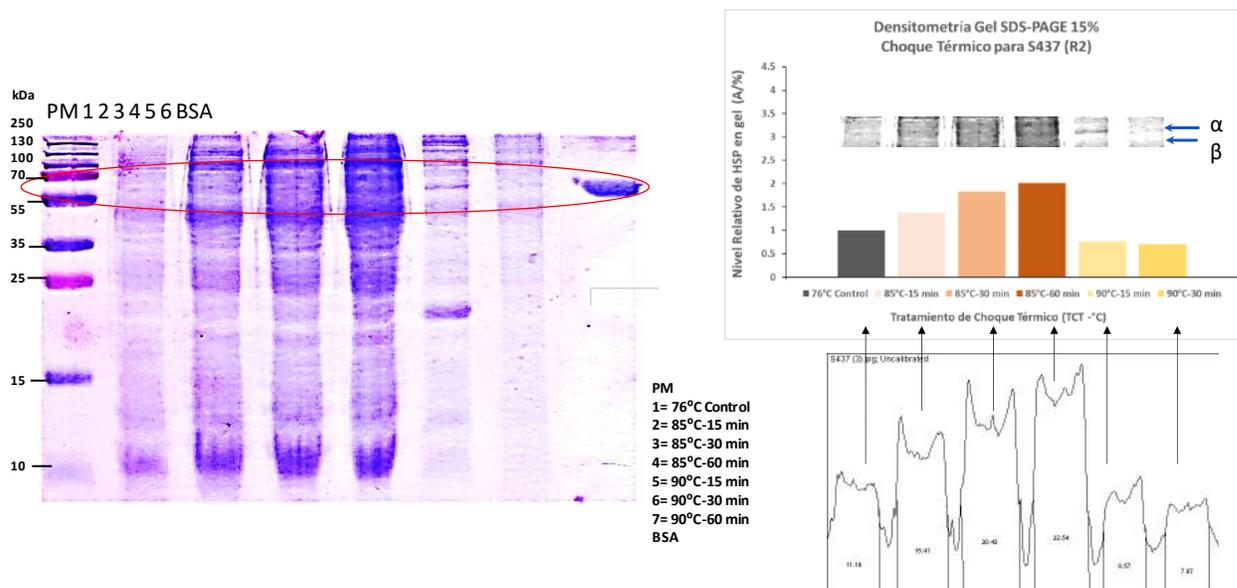
A

HEAT SHOCK (R1) *Sulfolobus solfataricus* P2 S437 SDS PAGE GEL 15%

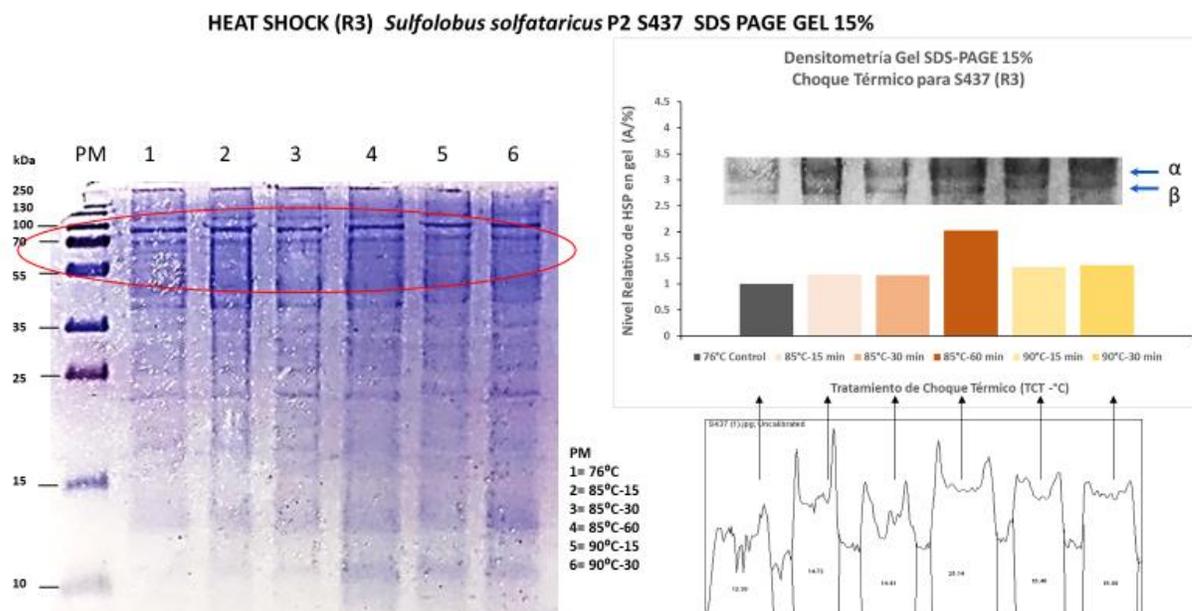


B

HEAT SHOCK (R2) *Sulfolobus solfataricus* P2 S437 SDS PAGE GEL 15%



C



Generado en ImageJ

D

HEAT SHOCK (R4) *Sulfolobus solfataricus* P2 S437 SDS PAGE GEL 15%

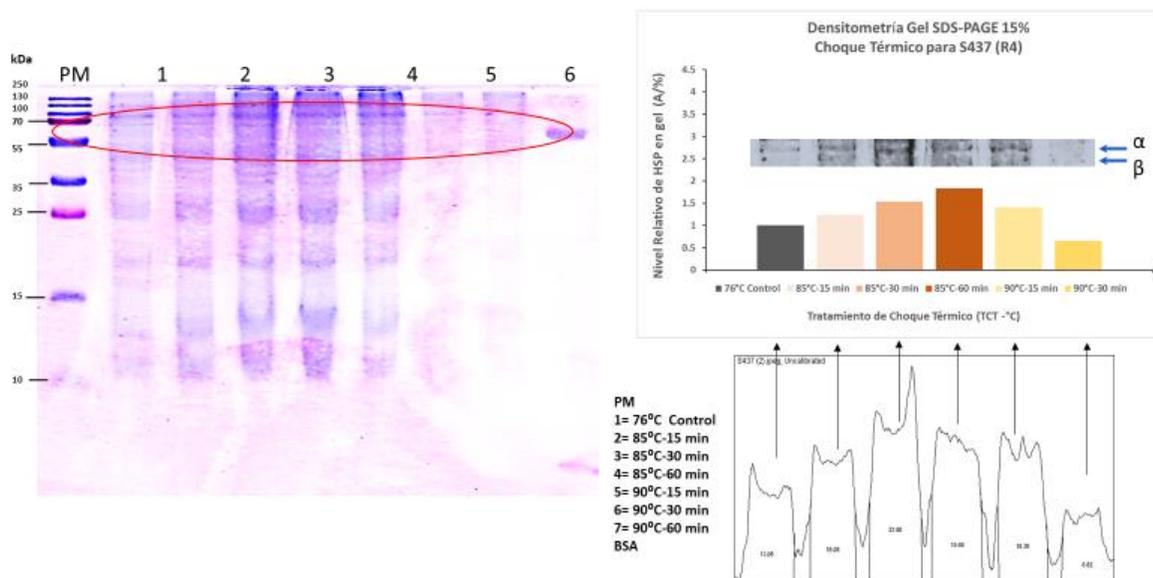


Figura 29. SDS-PAGE para choque térmico de *Sulfolobus solfataricus* P2. Resultados de electroforesis en gel de poliacrilamida para cuatro experimentos independientes. En cada imagen, a la izquierda, se evidencia el gel con tinción en azul de Coomassie; a la derecha inferior se exhibe la intensidad de las bandas en gel expresadas en áreas por el ImageJ; a la derecha superior se observa la densitometría de las bandas entre 55 y 70 kDa y, finalmente, por medio de la franja de las bandas de interés en escala de grises, se resaltan las bandas que, de acuerdo con su peso molecular, corresponden con HSP α y HSP β .

Las bandas expresadas a los 15 minutos del choque térmico presentaron una menor intensidad en contraste con las expresadas en los experimentos de estrés con 30 y 60 minutos ($15 < 30 < 60$), y en mayor densidad que el control a 76 °C. Lo anterior se comprobó a través del análisis densitométrico de los diferentes geles de las réplicas (Figura 30), expresado esto en el nivel relativo de HSP60 (área del perfil densitométrico) según el análisis de gel obtenido en el programa ImageJ.

Los valores del nivel relativo de HSP se normalizaron a uno con el valor del control a 76 °C en el promedio de las réplicas de los geles (Tabla 14). Así, todos los valores del nivel relativo de HSP en los geles obtenidos en los diferentes tratamientos del choque térmico fueron superiores en comparación con el cultivo de control no sometido al estrés térmico (Figura 30).

Temperatura/ Tiempo	CT S437, réplica (1)	CT S437, réplica (2)	CT S437, réplica (3)	CT S437, réplica (4)	Promedio +/- 0.3
76 °C Control	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
85 °C-15 min	1,19	1,23	1,86	1,38	1,41
85 °C-30 min	1,16	1,53	4,03	1,82	2,14
85 °C-60 min	2,03	1,83	3,56	2,01	2,36
90 °C-15 min	1,33	1,41	3,40	0,77	1,72
90 °C-30 min	1,36	0,66	3,34	0,70	1,52

Tabla 14. Nivel relativo de HSP en gel. Los valores de SDS-PAGE obtenidos en las réplicas se normalizaron con el control a 76 °C. De esta manera, se destacan las diferencias en el incremento de proteínas termoestables en los tratamientos por choque térmico frente al control. +/- Error de la media.

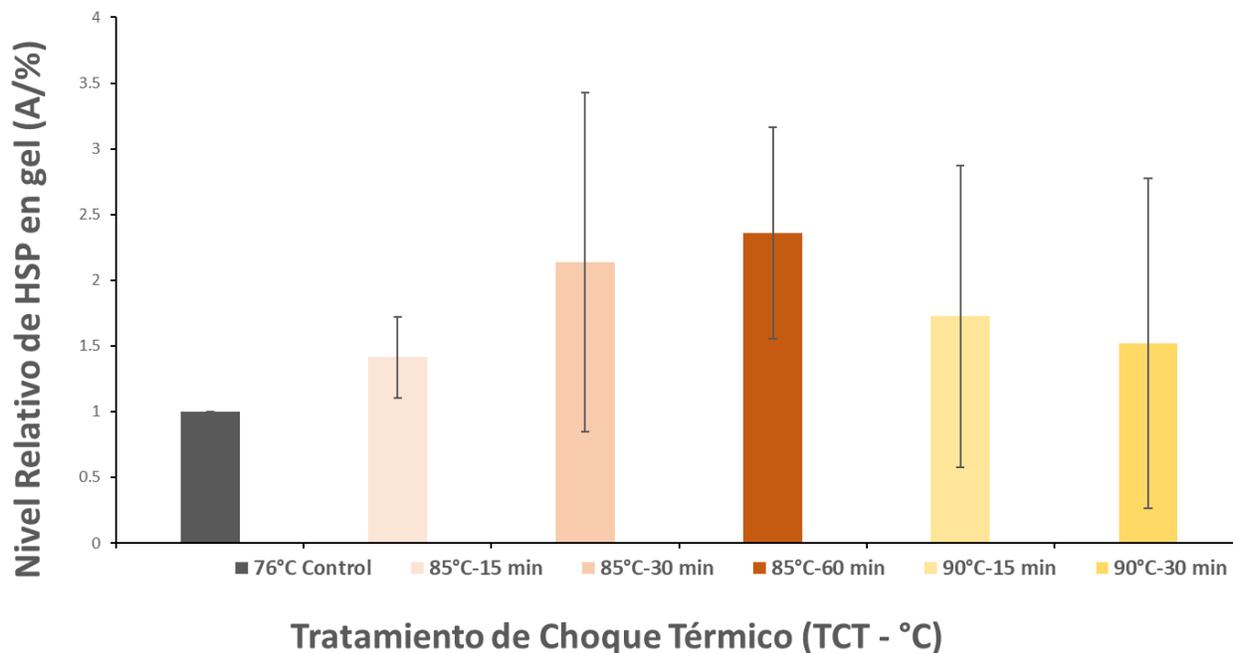


Figura 30. Análisis densimétrico del gel SDS-PAGE de choque térmico para *Sulfolobus solfataricus* P2. Para todos los tratamientos de estrés térmico desde 85 °C, el nivel de incremento se mostró superior al control, cuyas células no se sometieron a estrés térmico sostenido en 76 °C. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.2 Estrés por infección con virus SSV8 *Sulfolobus solfataricus* P2

De acuerdo con la metodología descrita, *Sulfolobus Solfataricus* P2 se sometió a estrés por infección con SSV8, pese a ello, no todas las especies de *Sulfolobus* son viables a la infección por SSV8 (Ceballos et al., 2012; Ceballos et al., 2020); por esta razón, para asegurar una infección efectiva del virus, se usó como huésped *Sulfolobus solfataricus* P2, pues ha tenido un reporte positivo de infección con esta especie (Ceballos et al., 2020).

Los matraces que contenían los cultivos en medio líquido fueron monitoreados cada cuatro horas, con el propósito de hacer un registro de la densidad óptica OD₆₀₀, así como establecer el crecimiento celular en la condición de infección y la de control no infectado. Para contabilizar y establecer la infección efectiva del virus sobre el huésped, se utilizó el ensayo de conteo de placas o halos sobre medio de cultivo sólido en cajas de Petri (Schleper et al., 1992) (Figura 31).

Los halos empezaron a ser evidentes a partir de las 26-30 horas postsiembra en la capa delgada de gel en el medio del agar 2XTS con pH: 3.13.

Estos se examinaron para determinar el aspecto de los halos turbios o transparencias que generan la inhibición del crecimiento del hospedador por el virus SSV8, tal como se observa en la Figura 31. De esta manera, se confirmó la infección exitosa por parte del virus al huésped (Uldahl et al., 2016).

En las diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} , los halos formados no eran contables y poco definidos, por ello, se eligió la dilución de 10^{-6} , donde los halos generados estaban en rangos numéricos contables. Para esto, se usaron tres replicas por cada muestra de dilución y se promedió el número de halos obtenidos en cada caja en los tres experimentos independientes consignados en la Tabla 15, con la finalidad de obtener un promedio general en la misma dilución para cada 24 horas postinfección hasta la hora 96 (Figura 32).

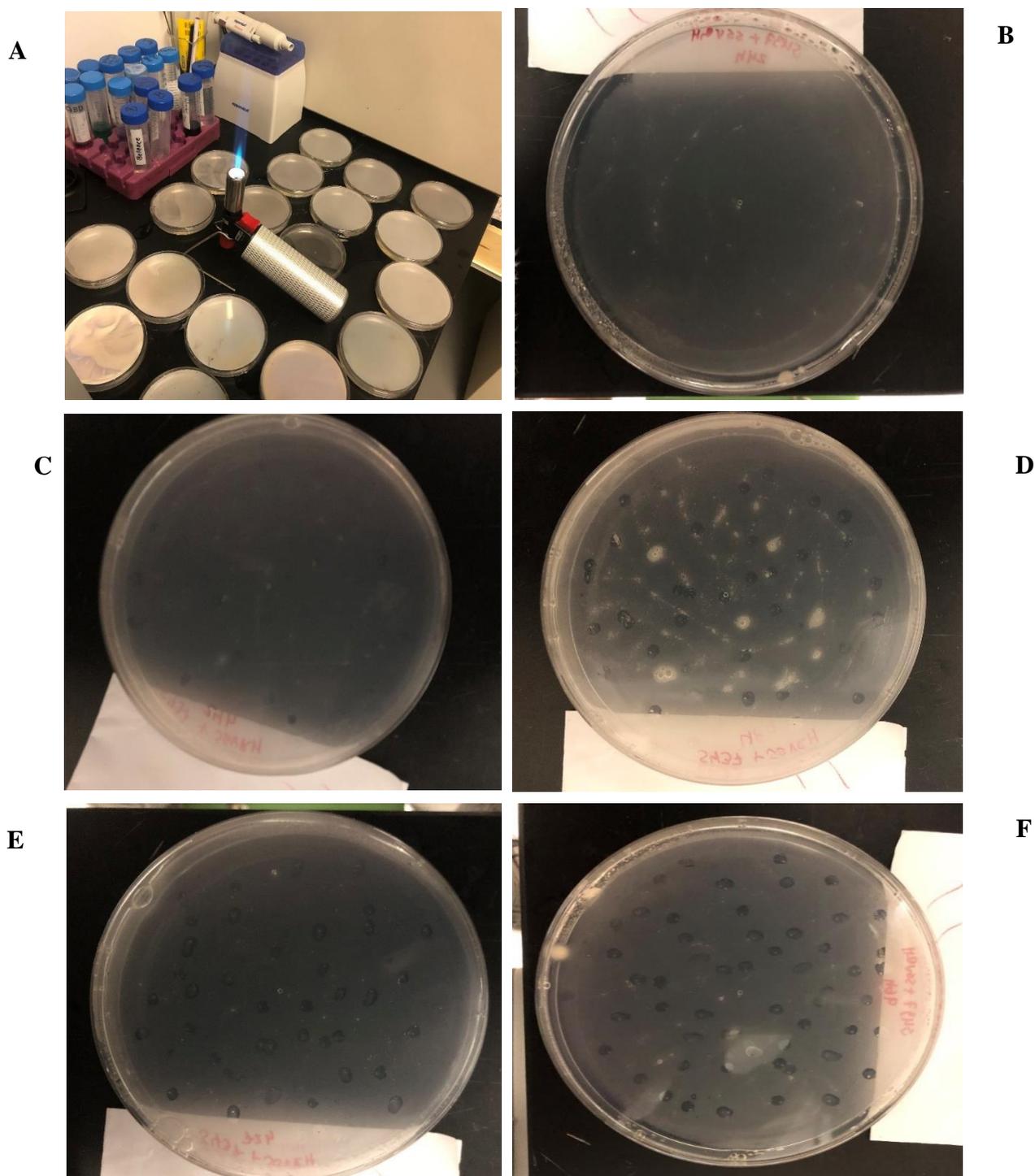


Figura 31. Titulación de virus por formación de halos. Para ello, las cajas de Petri se ubicaron en un ambiente estéril (A), el control no infectado no presentó halos (B), hubo formación de halos a las 24 HPI (C), a las 48 HPI (D), a las 72 HPI (E) y 96 HPI (F). Los halos se identificaron como áreas de “transparencias” en la capa superficial del gel, y el experimento de halos se realizó por triplicado; las imágenes muestran cajas seleccionadas.

Dilución sobrenadante con SSV8	Titulación de virus (HFU/mL) Réplica 1	Titulación de virus (HFU/mL) Réplica 2	Titulación de virus (HFU/mL) Réplica 3	Promedio (HFU/mL) +/- 0.2	Tiempo post infección (Horas)
10 ⁻⁶	5,44 x 10 ⁷	5,44 x 10 ⁷	5,44 x 10 ⁷	5,44 x 10 ⁷	0
	2,68 x 10 ⁸	2,75 x 10 ⁸	2,18 x 10 ⁸	2,53 x 10 ⁸	24
	3,75 x 10 ⁸	4,03 x 10 ⁸	3,90 x 10 ⁸	3,89 x 10 ⁸	48
	4,58 x 10 ⁸	5,68 x 10 ⁸	4,95 x 10 ⁸	5,07 x 10 ⁸	72
	5,60 x 10 ⁸	5,95 x 10 ⁸	4,98 x 10 ⁸	5,51 x 10 ⁸	96

Tabla 15. Titulación de SSV8 por conteo de halos. Los conteos de halos se tomaron a través de las muestras de cultivos infectados cada 24 horas y realizados por triplicado. +/- Error de la media.

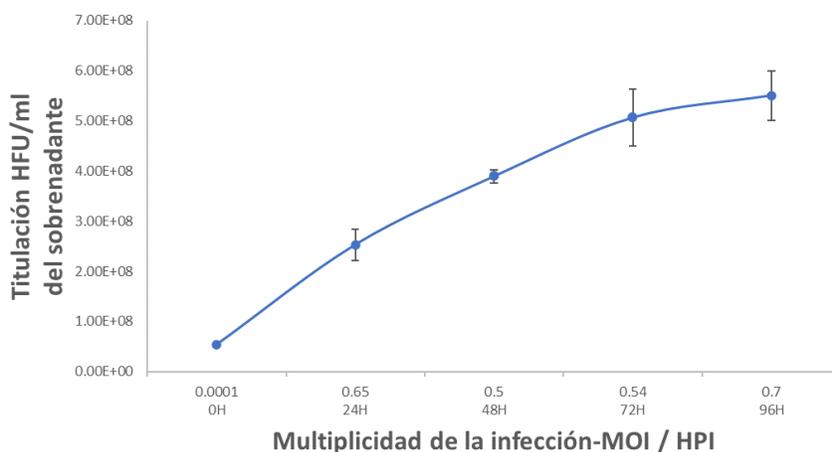


Figura 32. Cuantificación viral por formación de halos en infección a *Sulfolobus solfataricus* P2 por SSV8. Medio Tripton-Sacarosa 1XTS pH: 3,13 a 76 °C, MOI: 0.0001. La titulación viral se midió cada 24 horas y fue expresada en unidades formadoras de halos (HFU/mL). Se realizaron tres experimentos independientes, así, las barras de error representan la desviación estándar.

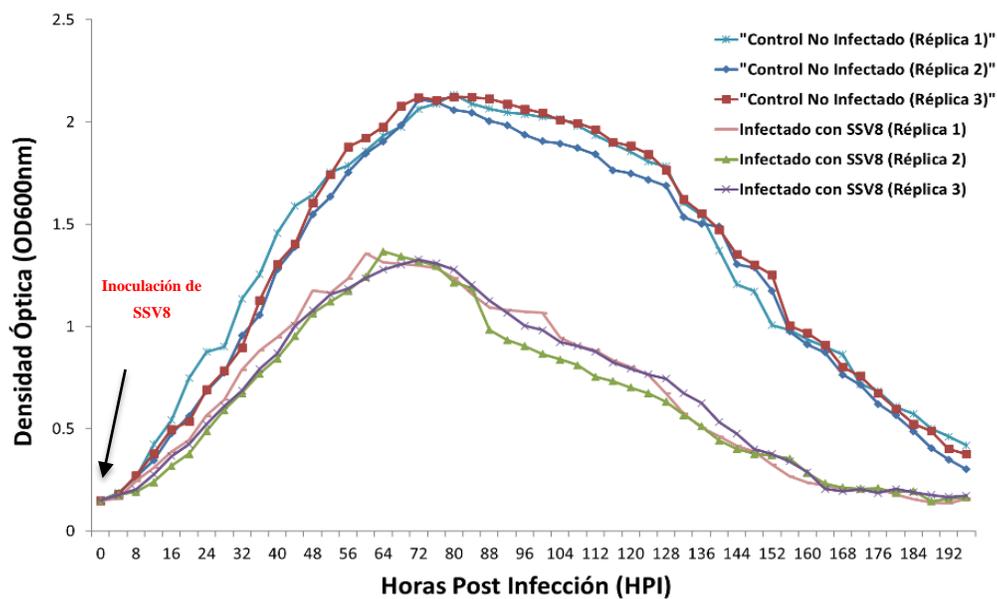
4.2.1 Fases del crecimiento de *Sulfolobus solfataricus* P2 bajo infección viral por SSV8

4.2.1.1 Fase de latencia.

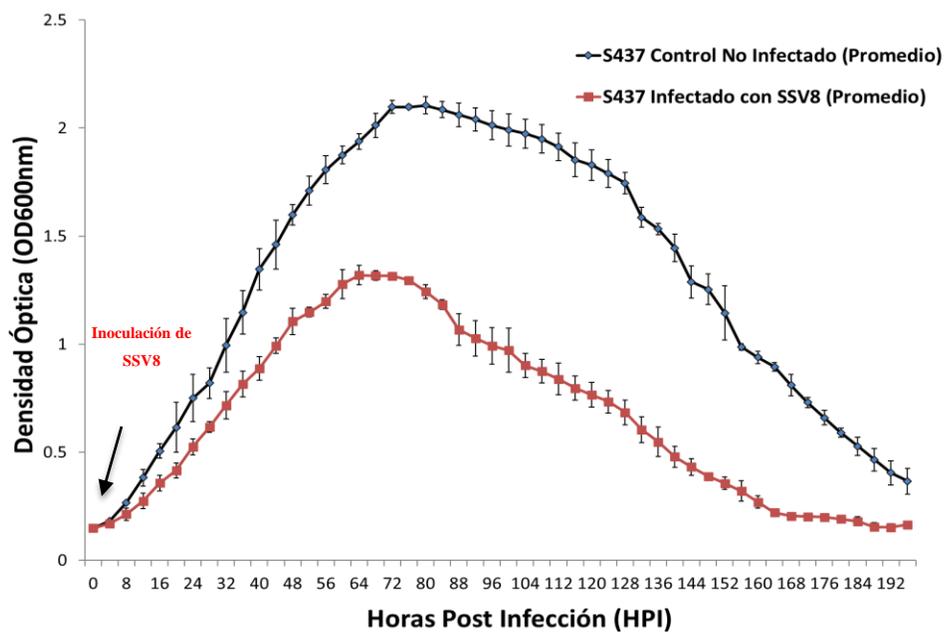
La infección de *Sulfolobus solfataricus* P2 por SSV8 reveló que el crecimiento de la arquea se ralentiza al estar en presencia del virus, por lo tanto, su fase exponencial denotó una leve reducción en comparación con el control no infectado, por ejemplo, a las cuatro horas postinfección, la densidad óptica de las células infectadas estaba en 0,169 (1,26 x 10⁸

células/mL), mientras el control no infectado reportaba 0,180 ($1,35 \times 10^8$ células/mL) (Figura 32).

A



B



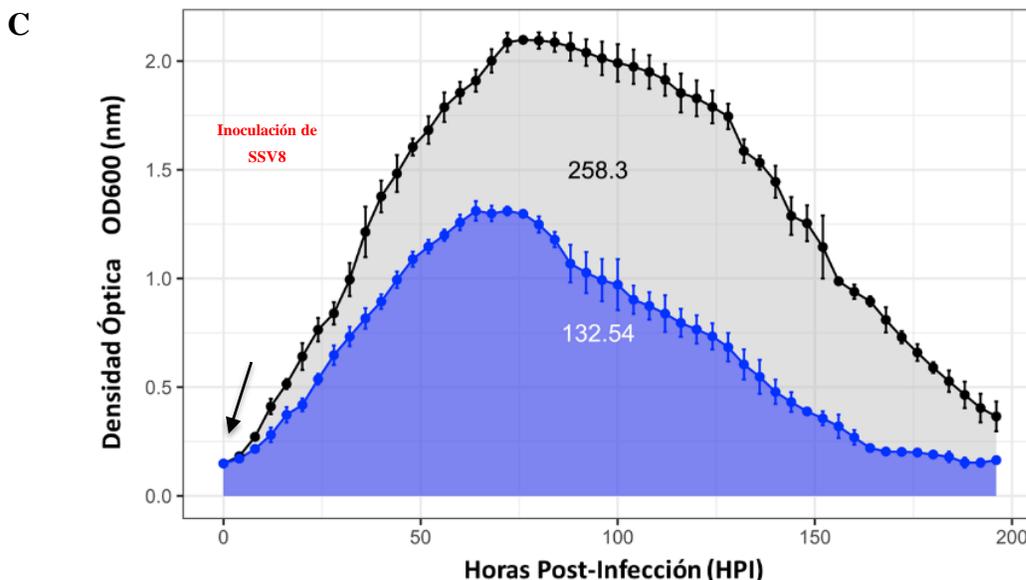


Figura 33. Curva de crecimiento de *Sulfolobus solfataricus* P2 infectado con SSV8. De manera concreta, se evidencia el cultivo en medio Tripton-Sacarosa 1XTS pH: 3,13 y 76 °C y tres réplicas de cultivos control no infectados (A). Los valores OD₆₀₀ son promedios de los triplicados del control a 76° C y de los cultivos infectados por SSV8 (B). El área bajo la curva representa un valor relativo de la población de células (C). La flecha indica el momento de la inoculación de SSV8 a un OD₆₀₀ ≈ 0,15. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.2.1.2 Fase exponencial.

La afección en el crecimiento celular por el proceso infeccioso empezó a ser más drástica a las 24 horas, así, para ese momento de la fase exponencial inicial, el cultivo de control llevaba $5,97 \times 10^8$ células/mL, mientras que el cultivo infectado reportaba, en promedio, $3,91 \times 10^8$ células/mL, es decir, una diferencia de 65,49 % entre los dos cultivos. Este proceso infeccioso estuvo sustentado por el nivel de producción de SSV8 en el mismo periodo de 24 horas con $2,53 \times 10^8$ HFU/mL y un MOI de 0,65 que tuvo incremento exponencial alto en referencia con el MOI de partida que fue de 0,0001 (Figura 32).

En la fase exponencial media, aproximadamente, a las 48 horas, la población infectada presentaba $7,91 \times 10^8$ células/mL frente a $1,23 \times 10^9$ células/mL del control no infectado,

representado esto en el 64,30 % de diferencia entre el control y el infectado, y un MOI de 0,5 que se redujo en comparación con el presentado a las 24 horas, pero con una presencia viral de $3,89 \times 10^8$ HFU/mL; esta vez, se dio un incremento en relación con la reportada a la hora 24 postinfección.

La fase exponencial de la población infectada tuvo un límite en la hora 64 postinfección, esto con una densidad óptica reportada de 1,308 ($9,8 \times 10^8$ células/mL) frente al control que estaba aún en crecimiento exponencial con $1,41 \times 10^9$ células/mL. Esto reflejó una alta inhibición en el crecimiento celular por parte de SSV8 en *Sulfolobus solfataricus* P2, pues llegó a reducir su etapa exponencial frente al control que la tuvo hasta la hora 80 de la postinfección.

4.2.1.3 Fase estacionaria.

La fase estacionaria fue prematura en las células de *Sulfolobus* infectadas por SSV8, lo que comprendió desde la hora 64 a la hora 80 posterior a la inoculación del virus (Figura 33 A-B) y sostuvo una concentración promedio de $9,7 \times 10^8$ células/mL en ese periodo. La fase estacionaria del cultivo de control promedio estuvo entre la hora 76 y 96 con una concentración de $1,55 \times 10^9$ células/mL, pero con una diferencia de 62,5 % de concentración del control no infectado frente al cultivo infectado consignado en la Tabla 15.

4.2.1.4 Fase de muerte.

La inhibición del crecimiento de *Sulfolobus solfataricus* P2 se expone en la Figura 33 C. La infección con SSV8 fue de más del 60 % desde la hora 24 de la inoculación del virus en el medio de cultivo hasta la hora 192, tal como se comprobó con el área bajo la curva del cultivo de control no infectado frente al cultivo infectado visualizado en la Figura 35. Esta fase fue constantemente en declive a partir de la hora 76 y 80 postinfección, esto en contraste con el grupo control que inició su fase de muerte en la hora 128, donde se halló una marcada afección por la presencia del SSV8 en las células *Sulfolobales* en su fase final; cabe resaltar que la producción viral en esta fase de muerte de los cultivos fue alta, lo que demostró un máximo aprovechamiento de las pocas células huéspedes disponibles.

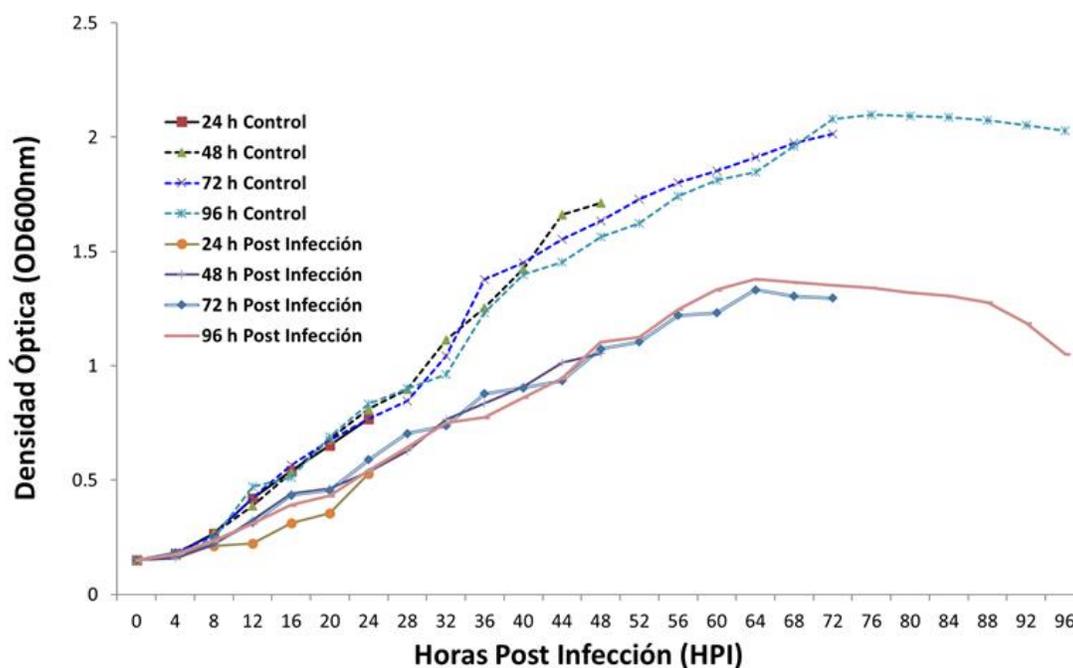
4.3 Producción de proteínas de choque térmico (HSP) por infección SSV8 en *Sulfolobus solfataricus* P2

Para evaluar la producción de HSP frente a la infección por SSV8, se generaron tres cultivos de infección independientes y se tomaron datos de OD₆₀₀ cada cuatro horas. A su vez, el contenido de los matraces se distribuyó para muestras de SDS-PAGE y para evaluar la transcripción de las subunidades HSP α y HSP β , respectivamente.

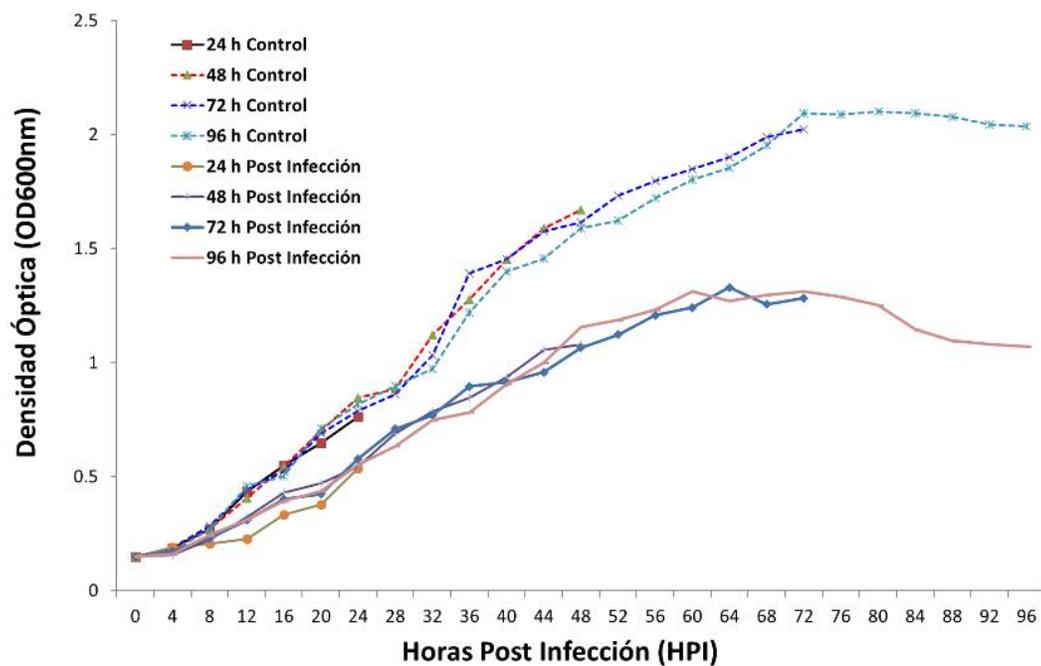
Al igual que en las curvas de crecimiento, el MOI de inicio fue relativamente bajo (0,0001) en la inoculación del medio de cultivo con las células de *Sulfolobus*; sin embargo, la relación de incremento de infectividad fue productiva de conformidad con la titulación viral por la formación de halos obtenida a partir de la muestra del sobrenadante tomado cada 24 horas postinfección; esto demostró un aumento relacionado con el crecimiento celular visto en la densidad celular de cada etapa de control postinfección, lo que reportó un MOI final de 0,7.

Finalmente, el comportamiento de la infectividad se mantuvo similar en las diferentes réplicas (Figura 34), por ello, fue importante tener en cuenta que todos los cultivos se homogenizaron en volumen y en densidad óptica ~0,15.

A



B



C

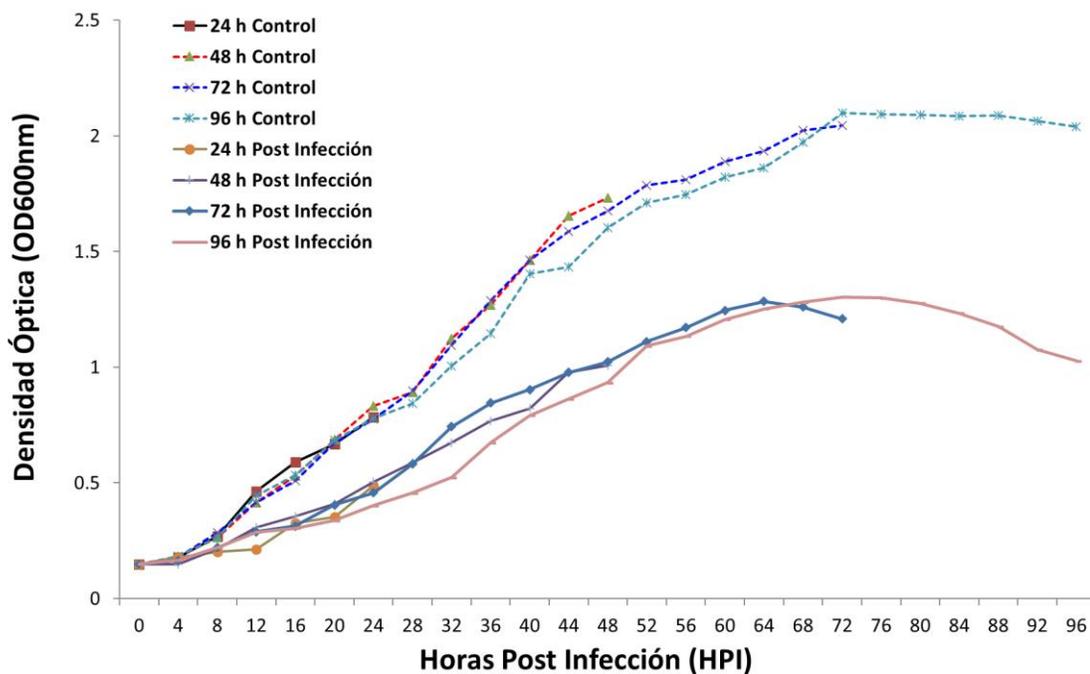


Figura 34. Curva de crecimiento de réplicas *Sulfolobus solfataricus* P2 infectado con SSV8. Cultivo en medio Tripton-Sacarosa 1XTS pH: 3,13 y 76 °C. Línea discontinua cultivos no infectados, línea continua cultivos infectados (A, B, C), y los experimentos independientes de infección por SSV8 con sus respectivos controles no infectados. Los cultivos fueron evaluados hasta la hora 96 postinfección. La inhibición del crecimiento en los cultivos infectados fue evidente en los tres eventos evaluados. Todos los cultivos (infectados y no infectados) partieron de un mismo $OD_{600} \sim 0,15$, en aras de homogenizar el cultivo y estandarizar las muestras evaluadas.

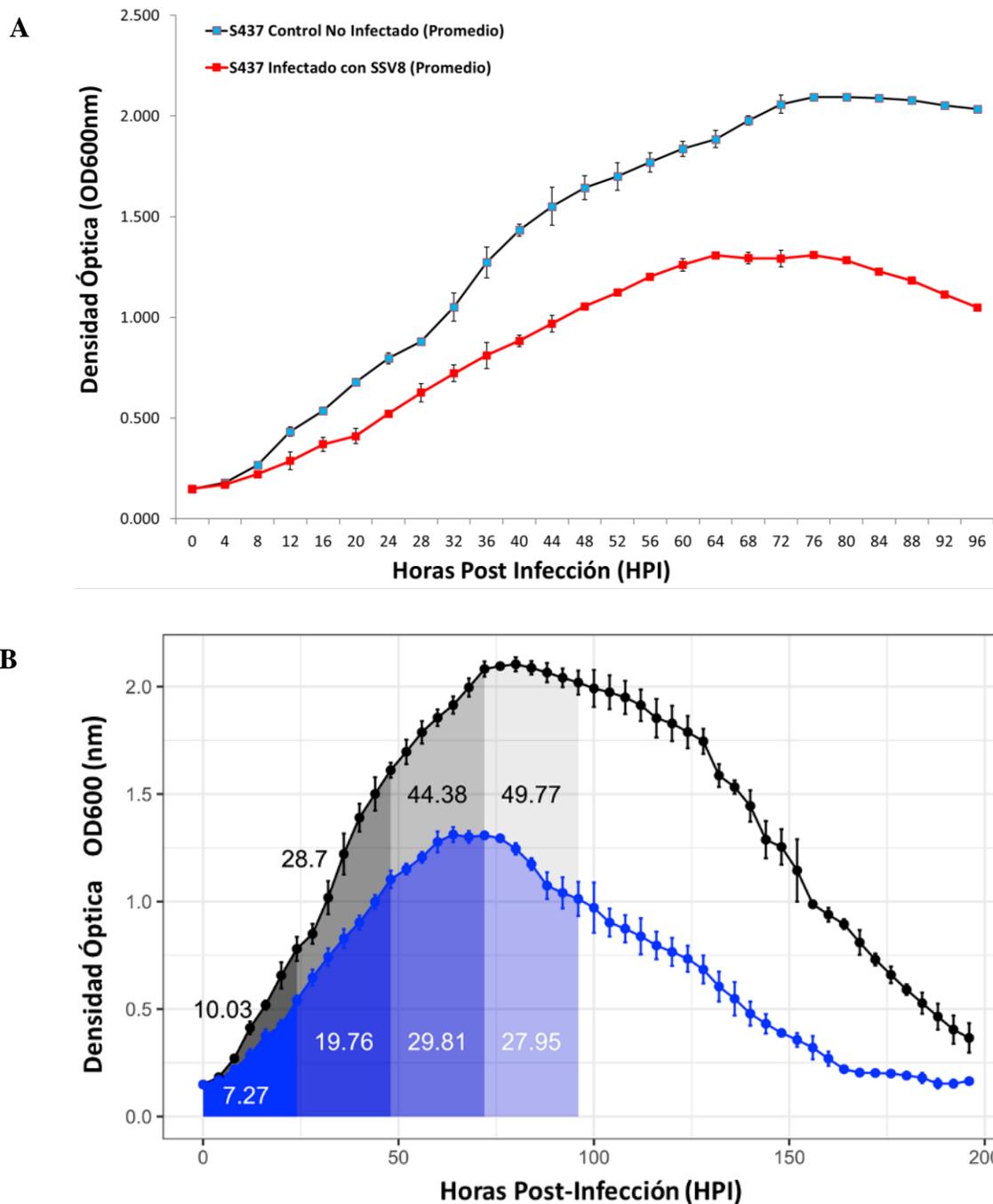


Figura 35. Curva de crecimiento promedio total de *Sulfolobus solfataricus* P2 infectado con SSV8. Cultivo en medio Trypton-Sacarosa 1XTS pH: 3,13 y 76 °C, el cultivo huésped no infectado frente a cultivo infectado en promedio total hasta la hora 96 (A), y el área bajo la curva estima la relación aproximada de población en los cultivos infectados vs. no infectados (B). Las barras de error representan la desviación estándar.

4.3.1 Cuantificación de proteínas

Los procedimientos para la extracción, la concentración y la purificación de proteínas en los experimentos de infección con *Sulfolobus solfataricus* P2 (S437) por SSV8 se realizaron bajo el mismo protocolo indicado en los tratamientos por choque térmico.

4.3.1.1 Purificación de lisado y ensayo Bradford.

El volumen de cada muestra procesada fue de 50 mL; para las primeras 24 horas, la población de *Sulfolobus solfataricus* P2 sin infectar presentó una densidad óptica (promedio obtenido de las réplicas procesadas) $OD_{600} = 0,771$ ($5,78 \times 10^8$ células/mL) frente a $OD_{600} = 0,518$ ($3,88 \times 10^8$ células/mL) de las células infectadas. A las 48 horas postinfección, las muestras no infectadas presentaron una densidad de $OD_{600} = 1,705$ ($1,27 \times 10^9$ células/mL) a $OD_{600} = 1,047$ ($7,85 \times 10^8$ células/mL) del cultivo infectado. A la hora 72 de haber ocurrido la infección, la muestra control presentó $OD_{600} = 2,028$ ($1,52 \times 10^9$ células/mL) y el medio con infección $OD_{600} = 1,263$ ($9,47 \times 10^8$ células/mL). En la hora 96 posterior a la inoculación con SSV8, la densidad óptica del cultivo de control reportó 2,035 ($1,52 \times 10^9$ células/mL) y el cultivo infectado un $OD_{600} = 1,050$ ($7,87 \times 10^8$ células/mL).

La diferencia porcentual de la densidad óptica entre los cultivos infectados y los cultivos control estuvo entre el 50 % y 68 % (Figura 35, B). Asimismo, la concentración de las proteínas totales se presenta en la Tabla 16 y en la Figura 36 A, lo que evidencia los leves incrementos en los tratamientos de cultivos infectados; la concentración de proteínas termoestables de la Tabla 17 y la Figura 36 B, obtenidas estas después del proceso de purificación al calor (92 °C-30 min), representó del 14 % al 18 % del contenido total proteico alcanzado después de cada periodo de infección.

Por último, los datos observados después de la purificación indicaron que los niveles de concentración de proteínas termoestables entre los cultivos de *Sulfolobus solfataricus* P2 infectados por SSV8 vs. los cultivos no infectados fueron mayores a las 24 y 48 HPI, y presentaron incrementos entre 1 µg/mL y 3 µg/mL (Figura 36, B).

HPI	S437+ SSV8 Réplica (1) ($\mu\text{g/mL}$)	S437+ SSV8 Réplica (2) ($\mu\text{g/mL}$)	S437+ SSV8 Réplica (3) ($\mu\text{g/mL}$)	S437+ SSV8 Réplica (4) ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio ($\mu\text{g/mL}$) +/- 4	D.O (Prom) +/- 0.05	Prom $\mu\text{g/DO}$
24 H Control	326,06	341,86	345,06	332,86	336,46	0,761	442,1
24 HPI	326,86	342,26	346,06	334,26	337,36	0,536	629,4
48 H Control	325,46	340,66	343,46	332,06	335,41	1,669	201,0
48 HPI	327,66	342,26	344,66	333,66	337,06	1,078	312,7
72 H Control	326,46	341,66	342,26	332,66	335,76	2,023	166,0
72 HPI	326,86	342,46	342,86	333,26	336,36	1,283	262,2
96 H Control	323,66	341,06	343,26	332,46	335,11	2,037	164,5
96 HPI	323,86	341,86	344,26	332,66	335,66	1,081	310,5

Tabla 16. Concentraciones de proteínas totales. Los lisados concentrados obtenidos en cada experimento se analizaron por el ensayo de Bradford para conocer la concentración de proteína total obtenida de las células infectadas con SSV8. La densidad óptica en las muestras infectadas fue menor que en el control no infectado, lo que indicó que un menor número de células producen mayores cantidades de proteína que las células no infectadas con una mayor población (valores promedio corregidos por la Densidad Óptica). +/- Error de la media.

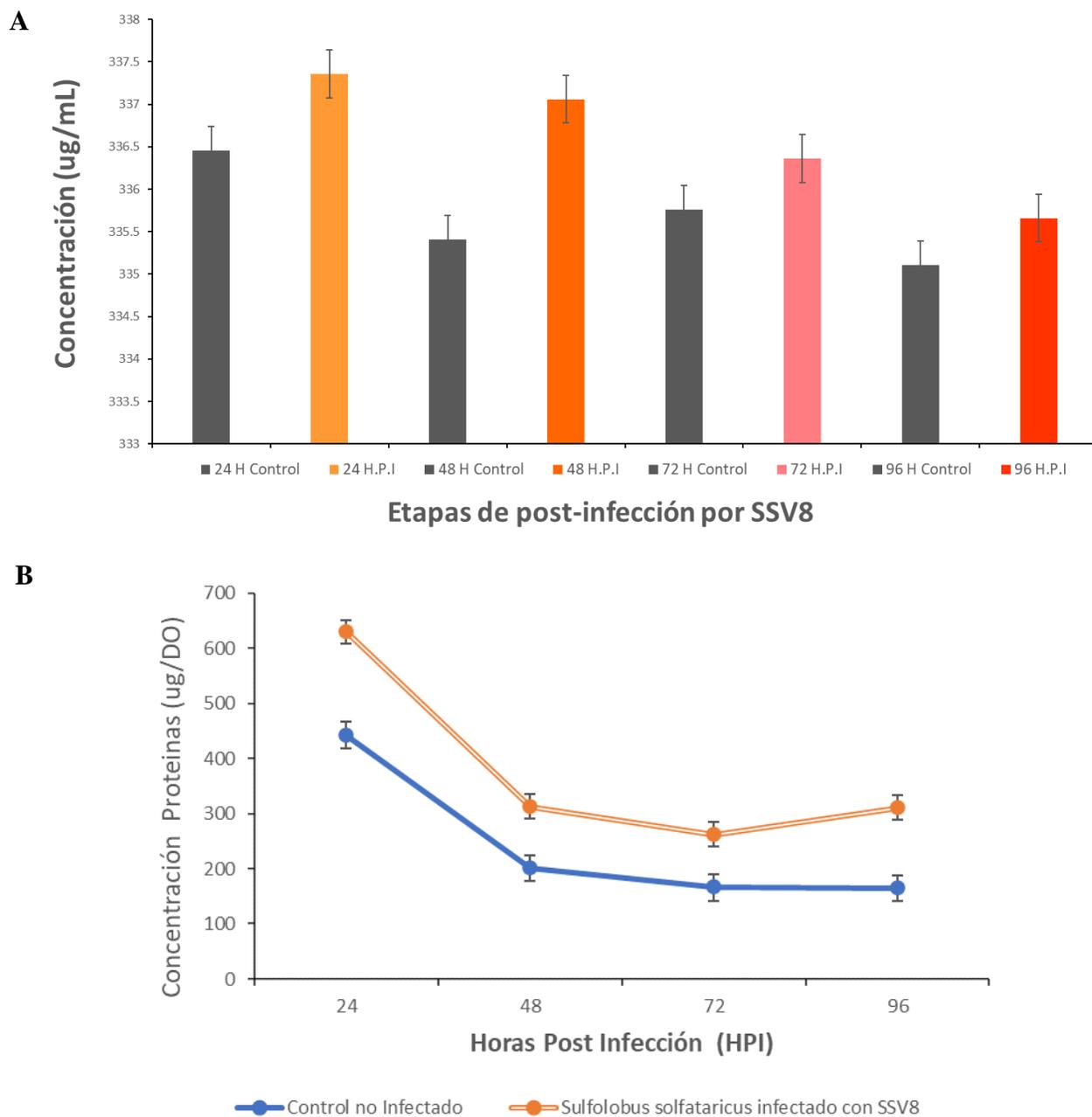


Figura 36. Niveles de concentración proteica total en células de *Sulfolobus solfataricus* P2 infectadas con SSV8. Obtenidos con ensayo de Bradford. (A) Comparación de cada etapa de infección con la muestra patrón no infectada. (B) Valores proteicos normalizados con la densidad óptica. Los niveles más altos de concentración proteica se presentaron a las 24 y 48 HPI. A las 72 y 96 HPI, la diferencia de los cultivos infectados vs. infectados también fue mayor. Las barras de error representan la desviación estándar.

HPI	S437+ SSV8 Réplica (1) ($\mu\text{g/mL}$)	S437+ SSV8 Réplica (2) ($\mu\text{g/mL}$)	S437+ SSV8 Réplica (3) ($\mu\text{g/mL}$)	S437+ SSV8 Réplica (4) ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio ($\mu\text{g/mL}$) +/- 2.5	D.O +/- 0.05	Prom $\mu\text{g/D.O}$
24H Control	55,46	47,86	57,66	61,86	55,71	0,761	73,2
24 HPI	56,06	54,66	59,06	62,86	58,16	0,536	108,5
48H Control	55,66	50,06	57,46	61,66	56,21	1,669	33,7
48 HPI	56,46	57,06	60,06	63,86	59,36	1,078	55,1
72H Control	55,66	46,46	57,06	62,06	55,31	2,023	27,3
72 HPI	56,26	54,86	58,46	63,66	58,31	1,283	45,4
96H Control	55,86	55,86	57,26	61,66	57,66	2,037	28,3
96 HPI	55,66	56,26	59,06	63,46	58,61	1,081	54,2

Tabla 17. Concentración de proteínas de choque térmico. Los lisados totales fueron sometidos a purificación con tratamiento térmico a 90 °C por 30 minutos, con lo que se obtuvieron las proteínas termoestables del lisado total y fueron tratadas con el ensayo de Bradford. La densidad óptica en las muestras infectadas fue menor que en el control no infectado, lo que indicó que un menor número de células producen mayores cantidades de proteína que las células no infectadas con una mayor población. Las concentraciones reportadas postpurificación representaron un ~17 % de las proteínas totales reportadas en las células estresadas. (Valores promedio corregidos por la Densidad Óptica). +/- Error de la media.

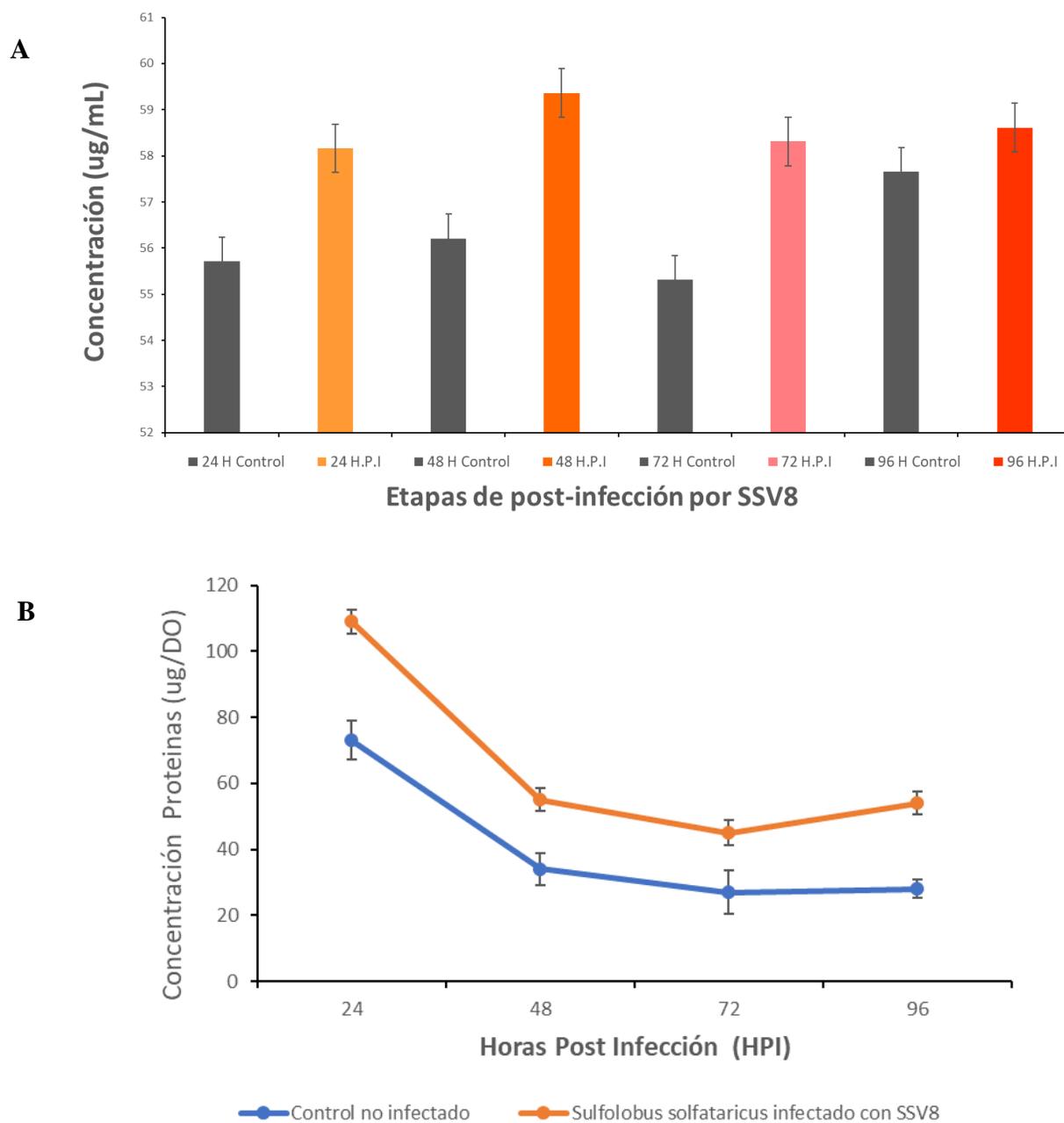
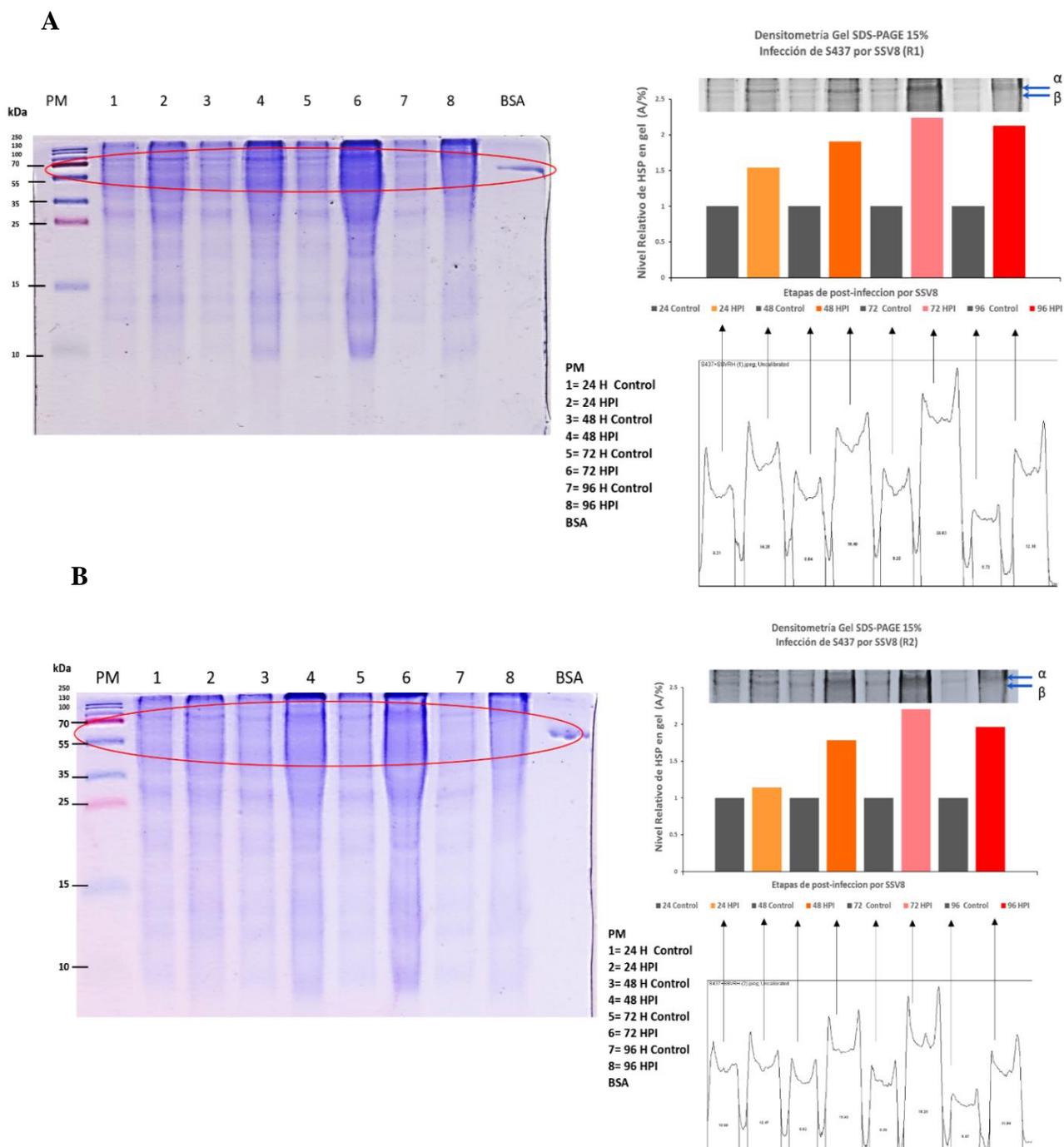


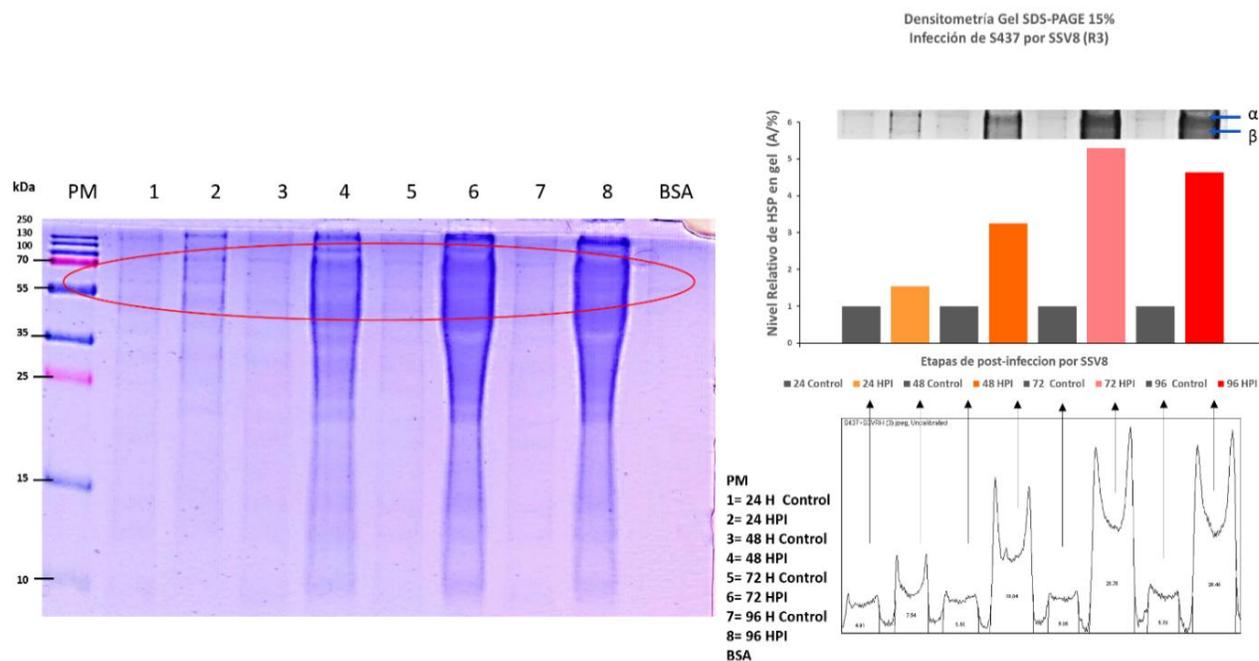
Figura 37. Niveles de concentración de proteínas termoestables en células de *Sulfolobus solfataricus* P2 infectadas con SSV8. Obtenidos con ensayo de Bradford. (A) Comparación de cada etapa de infección con la muestra patrón no infectada. (B) Valores proteicos normalizados con la densidad óptica. Los niveles más altos de proteínas termoestables se presentaron a las 24 y 48 HPI. A las 72 y 96 HPI, la diferencia de los cultivos infectados vs. infectados también fue mayor. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.3.1.2 Visualización de proteínas de choque térmico en *Sulfolobus solfataricus* P2 por infección viral de SSV8 en SDS-PAGE.

Los geles obtenidos luego de la separación electroforética presentaron una característica cualitativa en su inspección inicial, es decir, una intensidad mayor en las bandas que correspondían con los cultivos infectados por SSV8 frente a una menor intensidad en las bandas de control no infectadas (Figura 38).



C



D

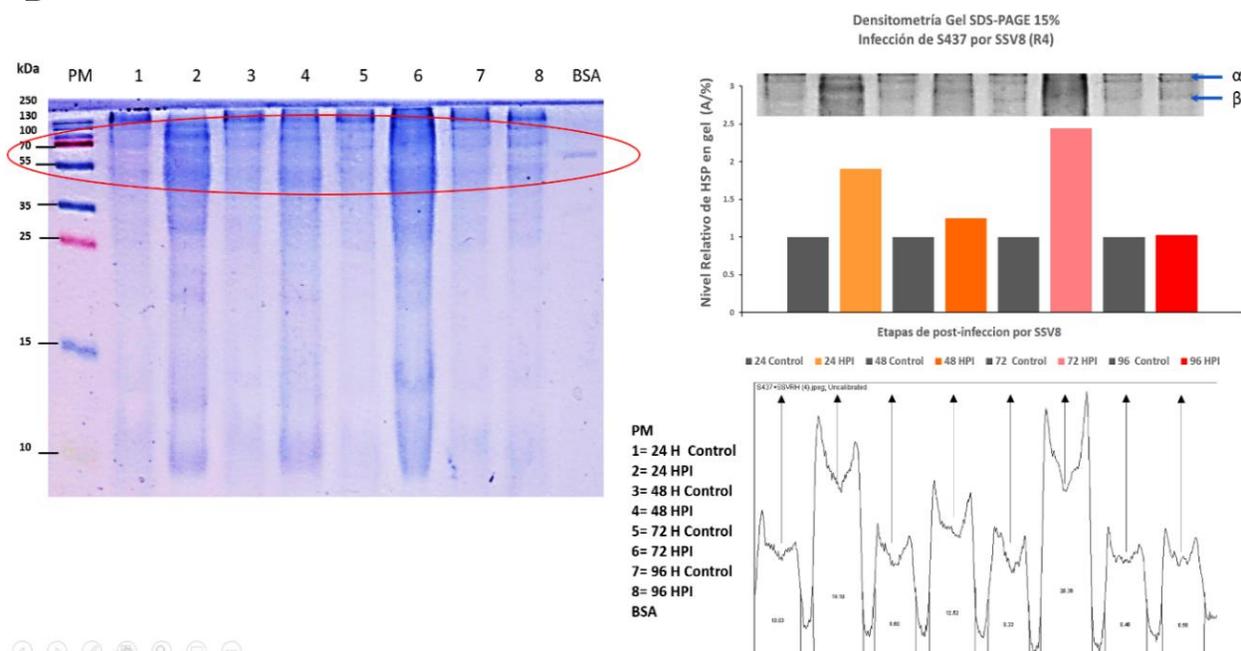


Figura 38. SDS-PAGE para infección de *Sulfolobus solfataricus* P2 por SSV8. Resultados de electroforesis en gel de poliacrilamida para cuatro experimentos independientes. En cada imagen, a la izquierda, se evidencia el gel con tinción en azul de Coomassie; a la derecha inferior, la intensidad de las bandas en gel expresadas en áreas por el ImageJ; a la derecha superior, se observa la densitometría de las bandas entre 55 y 70 kDa y, por último, a través de la franja de las bandas de interés en escala de grises se resaltan las bandas que, por su peso molecular, corresponden con HSP α y HSP β .

HPI	S437+SSV8 Réplica (1)	S437+SSV8 Réplica (2)	S437+SSV8 Réplica (3)	S437+SSV8 Réplica (4)	Promedio +/- 0.8
24 Control	1	1	1	1	1
24 HPI	1,540593	1,143958	1,536471	1,904847	1,531467
48 Control	1	1	1	1	1
48 HPI	1,908975	1,786051	3,250856	1,248255	2,048534
72 Control	1	1	1	1	1
72 HPI	2,240874	2,203281	5,29626	2,442525	3,045735
96 Control	1	1	1	1	1
96 HPI	2,126093	1,964426	4,639186	1,025532	2,438809

Tabla 18. Nivel relativo de HSP en gel. Los valores de SDS-PAGE obtenidos en las réplicas normalizados con el control a 76 °C. De esta manera, se destacaron las correspondientes diferencias en el incremento de proteínas termoestables en los tratamientos por choque térmico frente al control. +/- Error de la media.

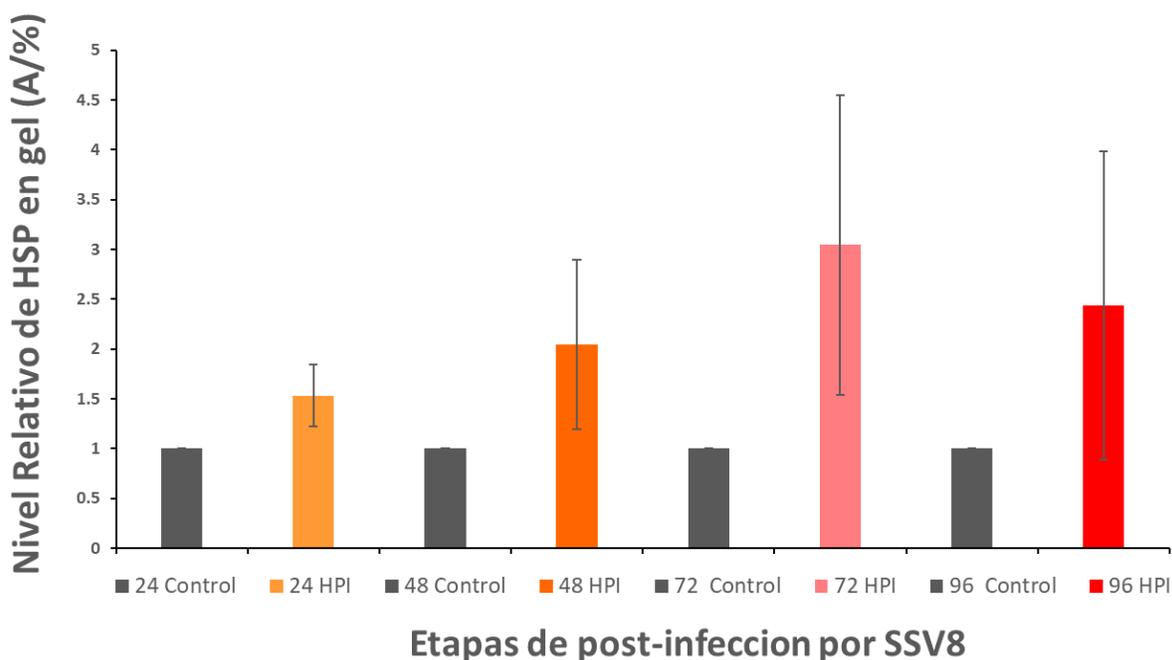


Figura 39. Análisis densimétrico para gel SDS-PAGE de infección viral por SSV8 para *Sulfolobus solfataricus* P2. Nivel relativo de HSP en gel. Para todos los tratamientos de estrés térmico desde 85 °C, el nivel de incremento se mostró superior al control, cuyas células no fueron sometidas a estrés térmico sostenido en 76 °C. Las barras de error representan la desviación estándar.

Por otra parte, las bandas se hicieron visibles de acuerdo con el peso molecular, así, para el caso de interés, las ubicadas alrededor de ~60 kDa estuvieron presentes con diferentes grados de intensidad y en la mayoría de los geles estudiados, por ello, fueron potencialmente apreciables dos bandas sugeridas correspondientes para HSP α y HSP β visualizadas en la Figura 37. Los resultados de la densitometría de las réplicas evaluadas con ImageJ fueron promediados y normalizados en relación con los valores de los controles no infectados, con la finalidad de estandarizar y evaluar los datos obtenidos con los cultivos infectados y consignados en la Tabla 18.

A las 24 horas, la infección viral a *Sulfolobus solfataricus* P2 por SSV8 marcó un incremento relativo de las HSP de 0,5 (relación área/intensidad) respecto con el control en el mismo periodo, tal como se muestra en la Figura 38. A la hora 48 de postinfección, el incremento de las HSP en los cultivos infectados fue de 1,0, de 2,0 para las 72 horas y 1,4 para las 96 horas; estos incrementos se establecieron en relación con los respectivos controles no infectados “cosechados” en los mismos periodos durante las horas posteriores a la infección, esto es, 72 y 96 HPI.

Asimismo, al observar el efecto de los puntos de tiempo en los valores, se evidenció la existencia de un patrón consistente y claro en el tiempo en el que las HSP aumentaron entre los intervalos de cada 24 horas, esto en las células infectadas frente a las no infectadas y los valores de porcentaje de inhibición significativamente más altos, tal como se expone en la Figura 40.

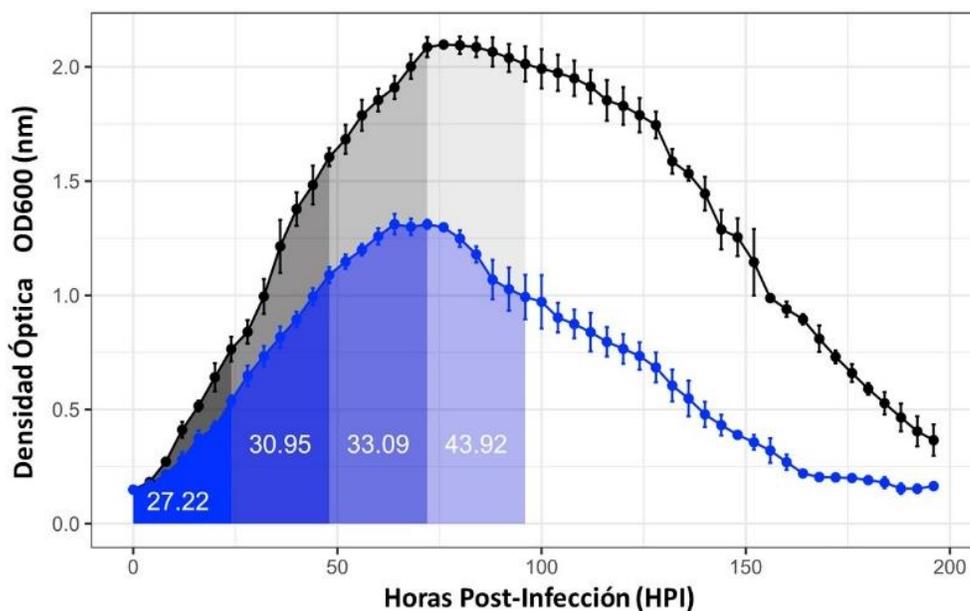


Figura 40. Porcentaje de inhibición 24-96 HPI. Los valores del AUC de acuerdo con lo realizado por Ceballos et al. (2020). Cada intervalo de tiempo mostró poblaciones reducidas pero constantes de *Sulfolobus solfataricus* P2 en todas las fases de crecimiento en comparación con el control no infectado. Se utilizó el área bajo la curva (AUC) como medida del porcentaje de inhibición (PI), así, SSV8 exhibe un PI de 8,57 %.

La diferencia poblacional entre los cultivos no infectados frente a los infectados con SSV8 estuvo alrededor del 51 %, esto conforme con los valores determinados en el AUC de la Figura 35. Cuando los cultivos específicos fueron cosechados cada 24 horas, los valores del AUC en cada intervalo de tiempo mostraron cómo la población de *Sulfolobus solfataricus* P2 presentaba poblaciones reducidas, pero constantes, en todas las fases de crecimiento en comparación con el control no infectado, lo que indicó que SSV8 tiene un comportamiento de reproducción y liberación viral no lítica, es decir, garantiza la liberación del virus sin generar la muerte en la célula hospedera (Ceballos et al., 2020).

4.4 Monitorización de la transcripción de genes *thsA* y *thsB* por qRT-PCR en las células sometidas a estrés térmico y viral

Para determinar los niveles de expresión de los genes *thsA* y *thsB* que codifican para la síntesis de las proteínas HSP α y HSP β bajo las condiciones de estrés térmico y viral, se extrajo el RNA

total de muestras de cultivo de las células de *Sulfolobus*. El RNA de *Sulfolobus solfataricus* P2 obtenido presentó ratios de absorbancia a 260/280 entre 1,8 y 2,1, esto como indicativo de RNA de alta pureza e integridad, igualmente, no se observó contaminación de DNA genómico, por lo tanto, se obtuvo un RNA no degradado (Figura 41).

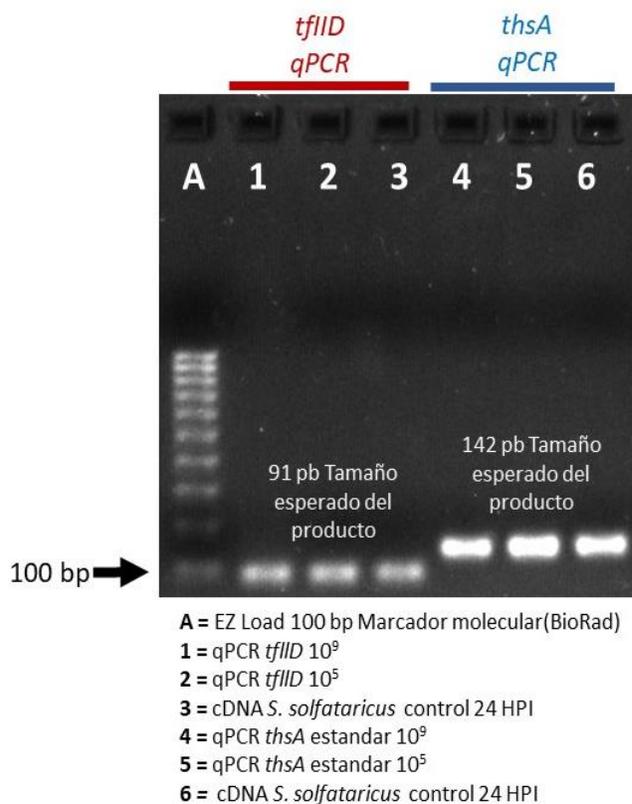


Figura 41. PCR en muestras de RNA después del tratamiento con DNasa. Las amplificaciones denotan que las muestras de RNA no tuvieron contaminación de DNA. Los cebadores utilizados HouseEXtFWD y HouseEXtREV se dirigieron al gen *tfIID* de mantenimiento (filas 1-3). En las filas de la cuatro a la cinco, el producto del gen de *thsA* de *Sulfolobus solfataricus* P2 a 24 horas de infección por SSV8.

Se utilizó el gen *tfIID* (factor de transcripción IID) como *housekeeping*, pues este constituye el complejo de preiniciación de proteínas útiles en la transcripción genética en arqueas, esto con el fin de tener un control endógeno y de mantenimiento comparativo con los productos previos de los genes *thsA* y *thsB* (Figura 41). Para el ensayo de qRT-PCR, se utilizaron 100 ng de cada cDNA (DNA complementario) de los genes de *thsA* y *thsB* en cada reacción, donde se llevó a cabo una retrotranscripción inversa para sintetizar DNA a partir del RNA que codificó para la

síntesis de las proteínas de choque térmico HSP α y HSP β , lo que incluyó el PCR estándar mostrado en la Figura 42.

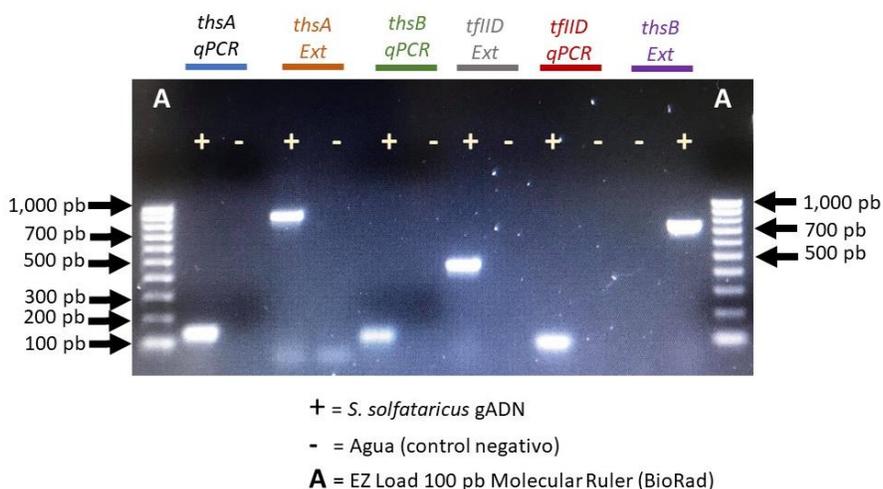


Figura 42. PCR para generación de los estándares. Durante el proceso de extracción de RNA, pudo estar presente DNA genómico, lo que pudo generar un falso resultado. Este gDNA se eliminó previo a la retrotranscripción del mRNA para garantizar una muestra de RNA con alta pureza.

Para la amplificación del cDNA, se emplearon oligonucleótidos específicos (*forward* y *reverse*), estos actuaron como cebadores de la acción de la polimerasa al permitir la amplificación de los genes que expresaron para *thsA* y *thsB* durante los eventos de estrés térmico y viral.

Durante el proceso de extracción de RNA, pudo estar presente DNA genómico, lo que pudo generar un falso resultado, debido a que este gDNA puede amplificarse durante la PCR, por esta razón, se eliminó dicho DNA previo a la retrotranscripción del mRNA para garantizar una muestra de RNA con alta pureza (Figura 42).

Para determinar la especificidad del cebador, se realizó el ensayo con un solo amplicón y sin dímero de cebador, así, los ensayos de qPCR se validaron mediante un gel de agarosa para asegurar que solo estaba presente el producto objetivo sin otros elementos como dímeros de los cebadores o *primers* (Figura 43).

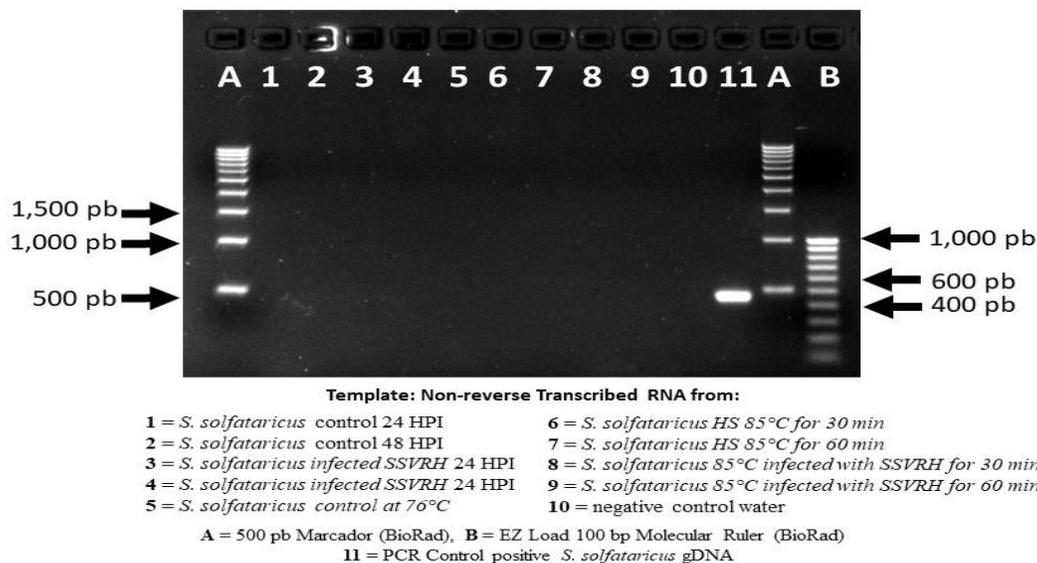


Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR de estándares y muestras. La especificidad del cebador y el ensayo con un solo amplicón y sin dímero de cebador. Asimismo, los ensayos de qPCR se validaron a través de un gel de agarosa para asegurar que solo estaba presente el producto objetivo sin otros elementos como dímeros de los cebadores o *primers*.

Otro medio de validación fueron las curvas de calibración (*melt curve*) con la química de SYBR *Green* en los ensayos de qPCR, cuyos picos observados fueron “limpios”, es decir, sin presencia de contaminantes, lo que garantizó la no presencia de productos secundarios para HSP α , HSP β y el gen *tfIID* (Figura 44).

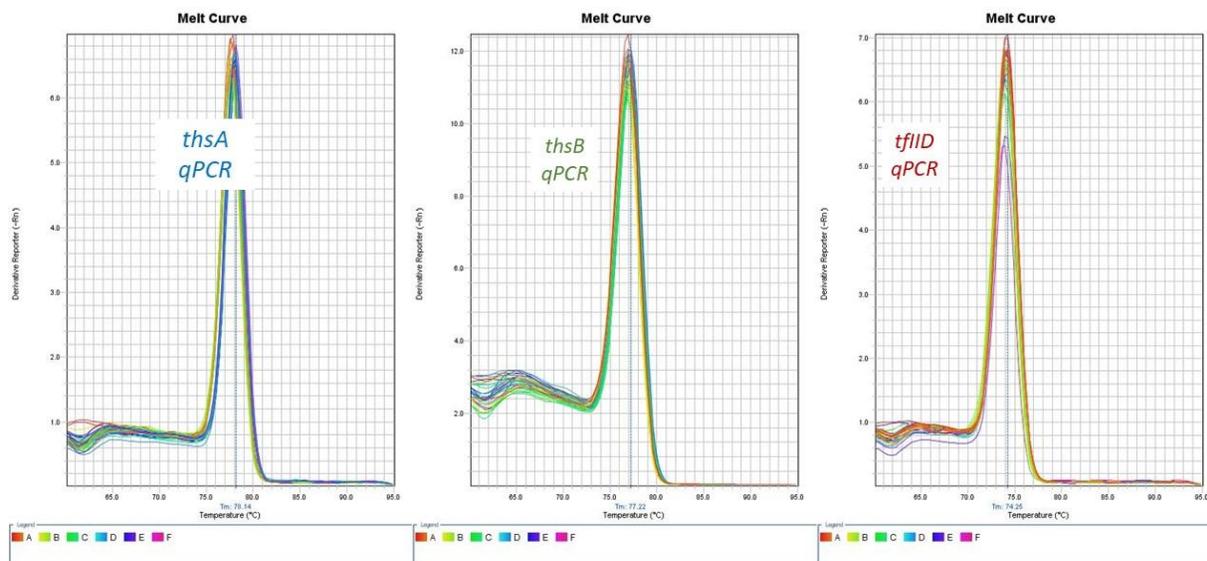


Figura 44. Análisis de la curva de fusión en cebadores y ensayos de qPCR de nuevo diseño. Se presentan los estándares y todas las muestras analizadas. Un solo pico muestra un solo producto y ningún dímero de cebador, mientras que los picos con la misma temperatura de fusión exponen la especificidad del objetivo (misma secuencia de producto).

Con el propósito de validar y estandarizar los resultados de qPCR, así como la transcripción de los genes que codificaron las subunidades proteicas HSP α y HSP β , se construyeron curvas estándar en un rango de 10² a 10⁸ copias de genes, con pendientes que iban desde -3,3 a -3,5 y con un valor R² de 0,960, lo que ofreció una mayor confianza (Figura 45).

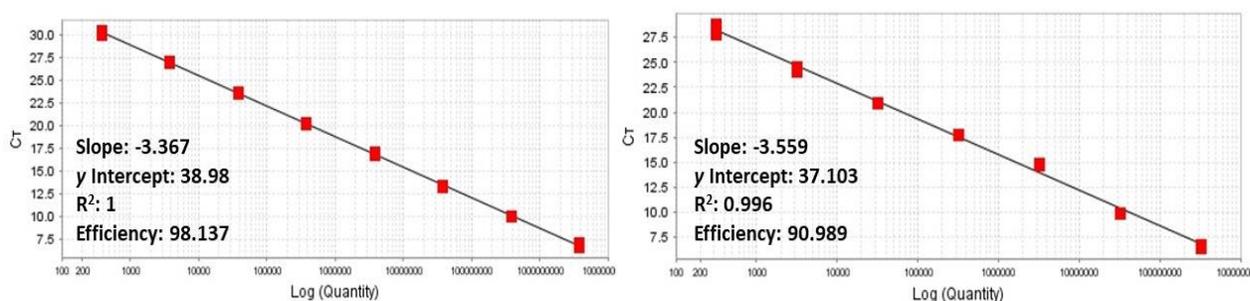
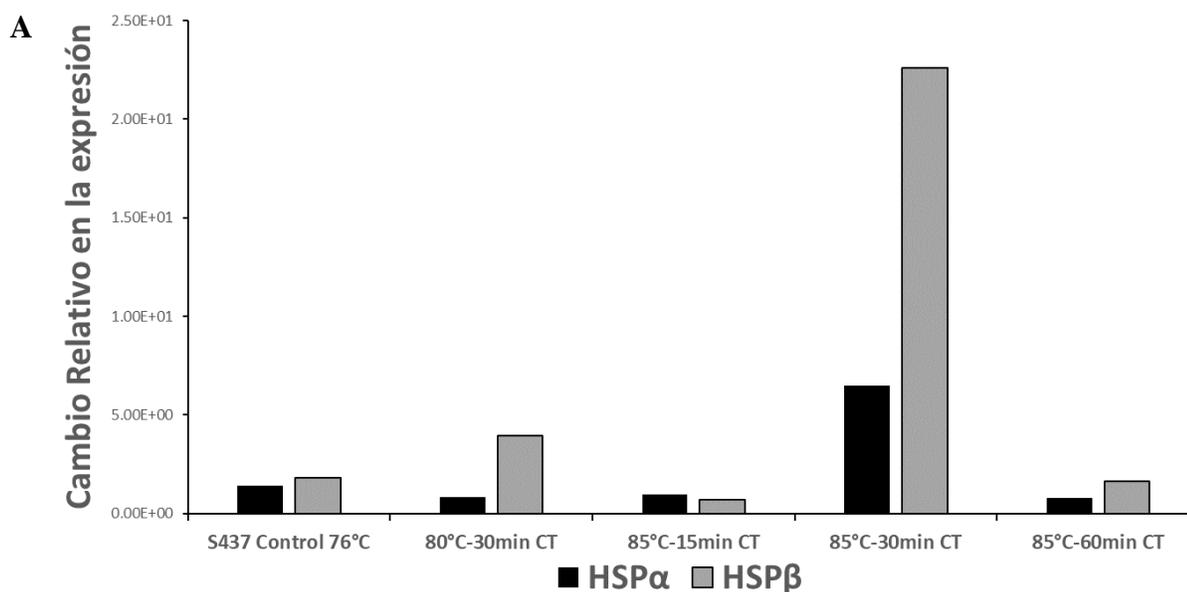


Figura 45. Curva estándar generada para los ensayos de qPCR alfa HSP α y HSP β . Se obtuvieron curvas lineales en un rango de 10² a 10⁸ copias de genes, con pendientes que iban desde -3,3 a -3,5 y valores R² de 0,960 a 1. Lo anterior con el fin de validar y estandarizar los resultados de qPCR, y la expresión de las subunidades HSP α y HSP β con un valor R² de 0,960, lo que ofreció una mayor confianza.

4.5 Transcripción de los genes de chaperoninas HSP α y HSP β en los diferentes escenarios de estrés en *Sulfolobus solfataricus* P2

4.5.1 En choque térmico

La expresión de HSP α y HSP β en los diferentes tratamientos de estrés por choque térmico (Figura 46) mostró niveles reducidos y estables en el control a 76 °C, donde se destacó un leve incremento de la subunidad HSP β respecto con HSP α . En el tratamiento del choque térmico a 80 °C por 30 minutos también se encontró esta diferencia, pero con un mayor incremento en los niveles de RNA mensajero de la subunidad HSP β frente a HSP α . En contraste, en los 85 °C, transcurridos 30 minutos del tratamiento, se encontró que HSP α y HSP β tuvieron una acumulación menor de mRNA significativamente más baja, incluso, en comparación con la el cultivo de control y los tratamientos previos.



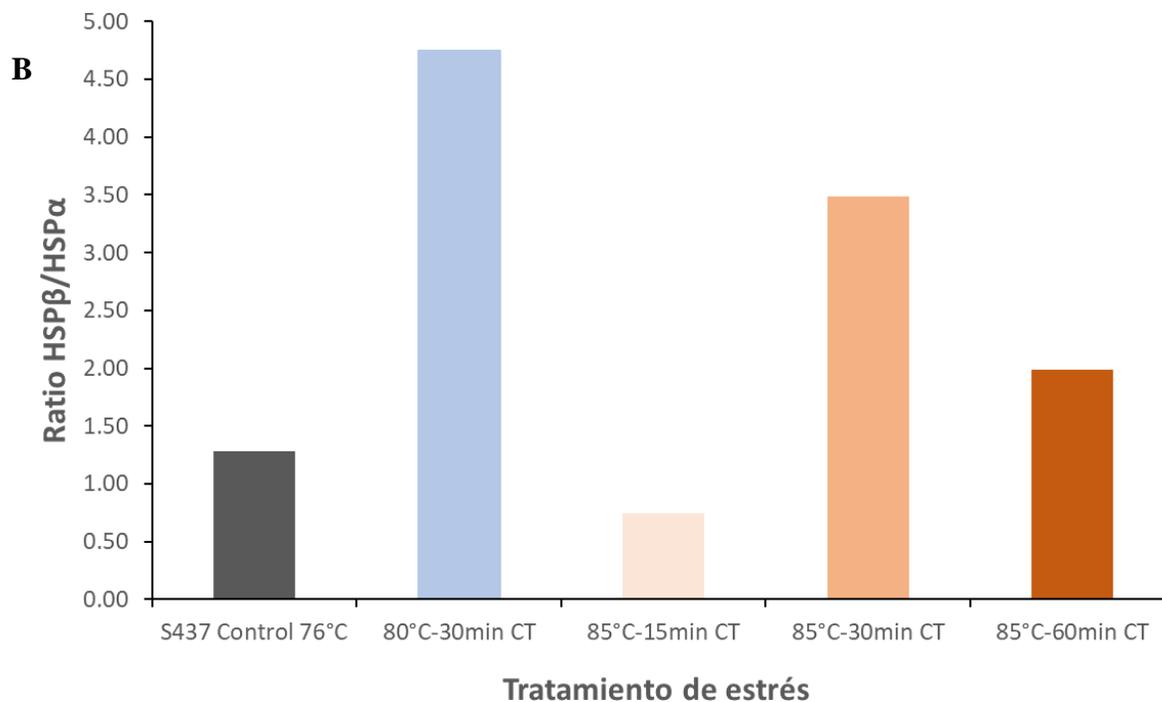


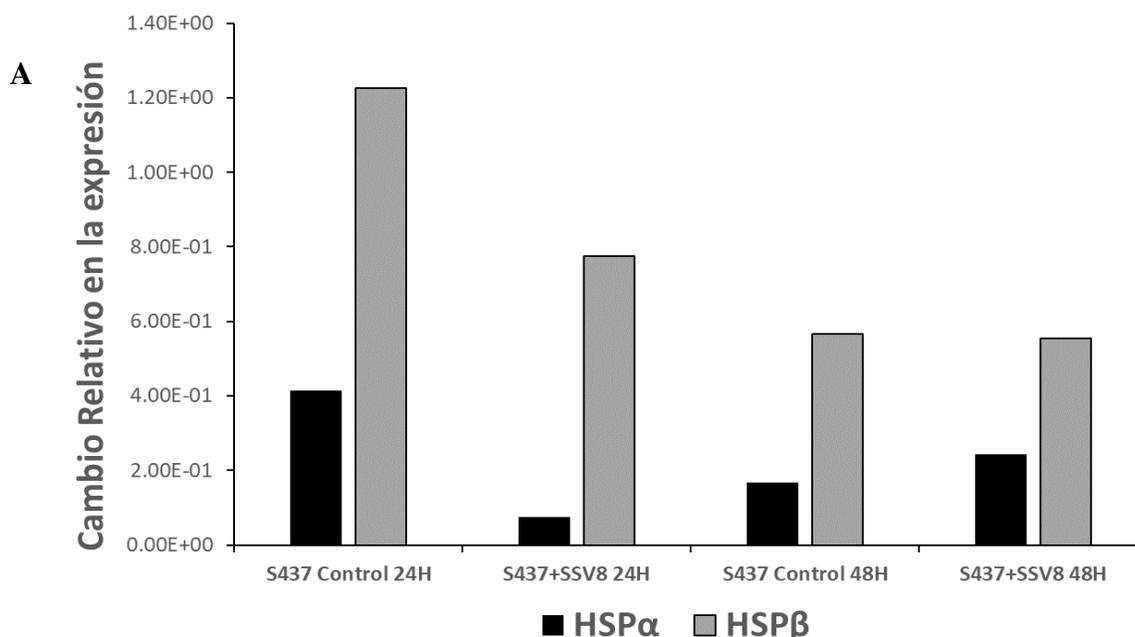
Figura 46. Cuantificación relativa de las transcripciones del gen HSP α y HSP β en *Sulfolobus solfataricus* P2 en choque térmico. A.) Mostró niveles reducidos y estables en el control a 76 °C, leve incremento de la subunidad HSP β respecto con HSP α . En choque térmico a 80 °C por 30 minutos, se encontró esta diferencia, pero con un mayor incremento en los niveles de mRNA de la subunidad HSP β frente a HSP α . A los 85 °C por 30 minutos, HSP α fue mayor que el control y los tratamientos a menor temperatura de estrés. B.) La ratio entre los genes que codificaron cada subunidad estableció la prevalencia al alza de HSP β sobre HSP α en las diferentes condiciones de estrés, excepto en el episodio de estrés a los 85 °C por 15 minutos.

Según lo determinado por el cambio en la transcripción del gen *tfIID* de mantenimiento, HSP β presentó un máximo en la transcripción a los 30 minutos de estrés térmico a 85°C en contraste con HSP α . Después de 60 minutos a 85°C, los transcritos de ambas subunidades se igualaron con niveles similares del cultivo control no estresado. La acumulación de mensajeros diferencial de HSP β , en comparación con HSP α a los 30 minutos de estrés a 85°C, concordó con lo planteado por Chaston et al. (2016) y Trent et al. (1990).

4.5.2 En infección por SSV8

En los experimentos donde *Sulfolobus solfataricus* P2 se infectó con SSV8, se establecieron periodos de medición de la infección cada 24 horas, asimismo, se evaluaron las muestras de las 24 y 48 horas, esto en consideración de que este tiempo correspondió con los periodos de más incremento poblacional de la fase exponencial, puesto que, para la hora 72 postinfección, las células estaban en fase estacionaria y, en el periodo de la hora 96, el cultivo presentaba cierre de la fase estacionaria e inicio de la fase de muerte celular.

El control de células de *Sulfolobus* no infectadas mantuvo las mismas condiciones de crecimiento (76 °C y 120 rpm). Por otro lado, los cultivos infectados, exitosamente (densidad óptica ~ 0,15), en el inicio de la fase exponencial mostraron niveles bajos de transcripción de los genes codificantes de HSP α y HSP β , en comparación con el control a las 24 horas, pese a ello, resaltó una diferencia amplia en la expresión del gen HSP β frente al gen HSP α en el mismo periodo postinfección (Figura 47). Finalmente, a las 48 horas del proceso infectivo, la transcripción de genes HSP α y HSP β tuvo un comportamiento similar al presentado en el control no infectado; de este modo, en ambos grupos observados, se identificó un incremento considerable en la expresión de los genes de HSP β frente a HSP α . En los cuatro tiempos evaluados de los cultivos infectados y no infectados, la expresión del gen HSP α fue menor en todos los intervalos de tiempo, esto en contraste con la expresión obtenida en HSP β , la que marcó un pico máximo de 10,49 veces superior respecto con HSP α .



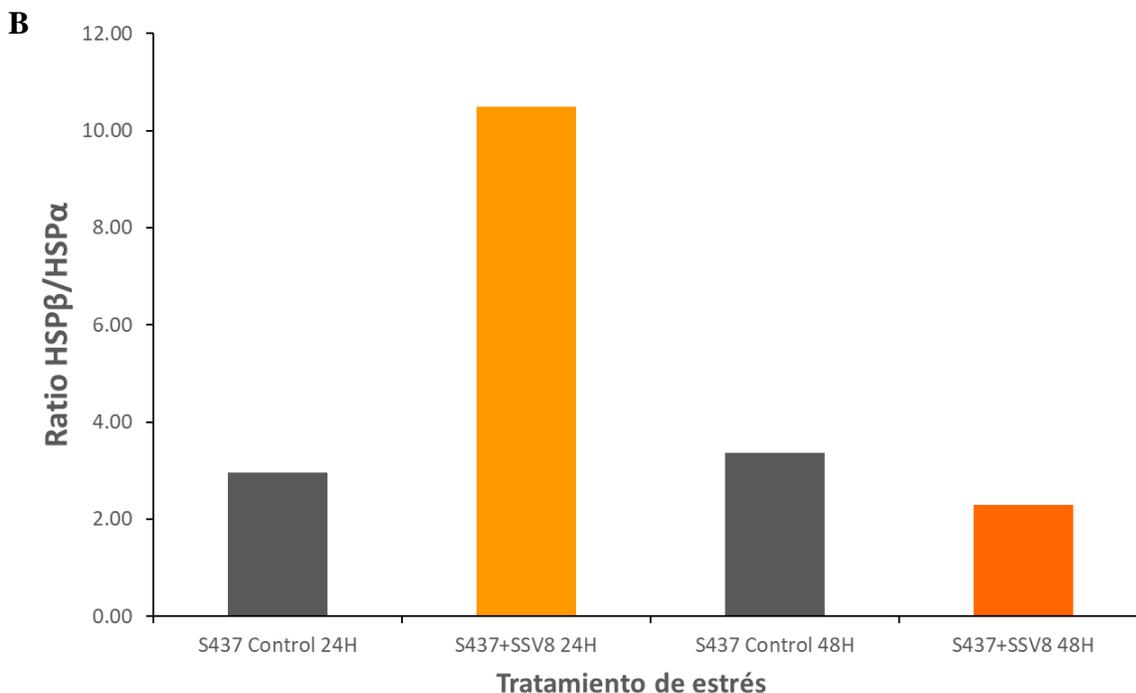


Figura 47. Cuantificación relativa de las transcripciones del gen de HSP α y HSP β en *Sulfolobus solfataricus* P2 infectados con SSV8. A.) Niveles bajos de transcripción de los genes codificantes de HSP α y HSP β en los cultivos infectados en comparación con el control a las 24 HPI, así, se destacó una diferencia amplia en la expresión del gen HSP β frente al gen HSP α . A las 48 horas del proceso infectivo, la transcripción de genes HSP α y HSP β tuvo un comportamiento similar al presentado en el control no infectado. B) La ratio entre los genes que codifican cada subunidad mostró la prevalencia al alza (2x) de HSP β sobre HSP α en las diferentes condiciones de estrés, y con un máximo cinco veces superior a las 24 HPI.

La transcripción de los genes HSP α y HSP β fue menor en los cultivos infectados que en los controles no infectados a las 24 HPI, mientras que esos niveles se igualaron a las 48 HPI. El gen HSP β tuvo un mayor nivel de transcripción frente al gen HSP α a las 24 HPI, esto con una razón de 10,49 y a las 48 HPI de 2,29; estos niveles indicaron que estos genes codificaron HSP α y β como una sugerida reacción por parte de *Sulfolobus* ante la infección por SSV8.

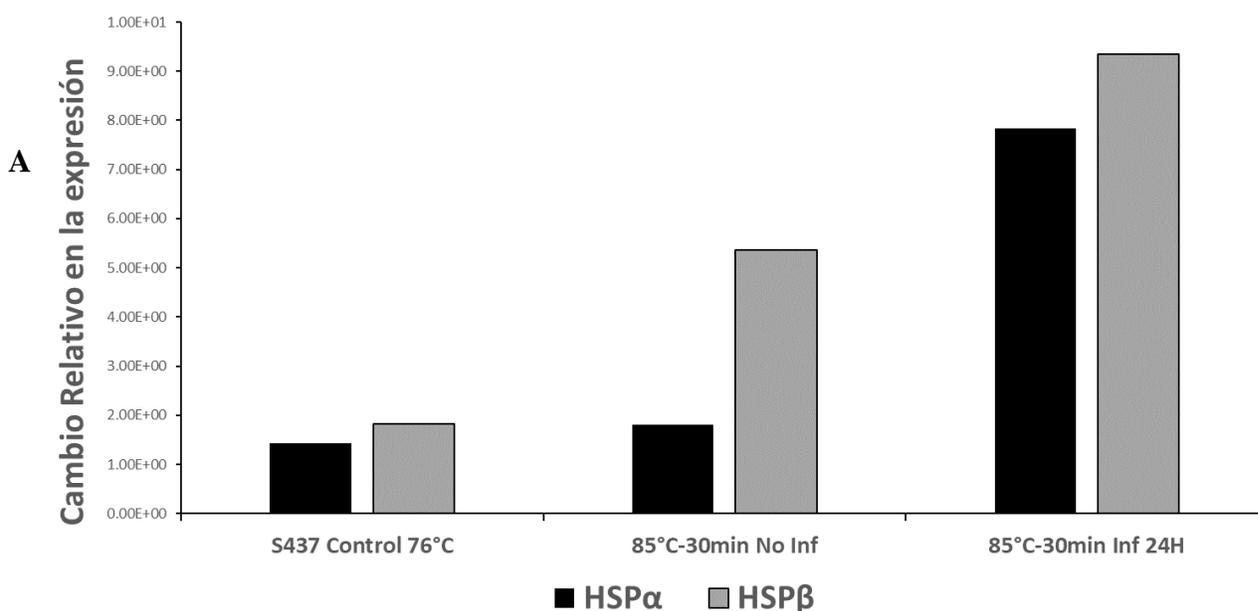
4.5.3 En infección por SSV8 + choque térmico

En consideración con los resultados observados en los eventos de estrés por choque térmico a 85 °C, las células *Sulfolobus solfataricus* P2 infectadas por SSV8 a las 24 y 48 horas postinfección se sometieron a estrés térmico a 85 °C durante 30 y 60 minutos; así, se mantuvo un cultivo de

control no infectado a 76 °C y a 120 rpm, y cultivos de control no infectados, pero sí sometidos a estrés térmico a 85 °C por 30 y 60 minutos. La determinación de los niveles de RNA mensajero de los genes HSP α y HSP β en estos eventos sugirió que la expresión de HSP β fue mayor a HSP α en todas las condiciones evaluadas en control y en choque térmico e infección, lo que presentó los máximos niveles a los 30 minutos del estrés térmico en células no infectadas e infectadas (Figura 48).

Finalmente, en este mismo periodo de los 30 minutos del estrés térmico, los cultivos infectados por SSV8 presentaron un aumento en los niveles de mRNA de los genes de HSP α y HSP β (Figura 48 A), por ello, se tomó como referencia el control no infectado, incluso, al comparar los demás tratamientos. Se destacó, en este escenario de doble condición de estrés, que el gen HSP α tuvo un incremento a razón de 0,84 frente a 0,34 del escenario no infectado.

Los periodos del estrés térmico de 30 y 60 minutos a los que fueron sometidas las células infectadas señalaron que, aun en condiciones de doble estrés, las células Sulfolobales infectadas por SSV8 presentaron altos niveles de transcripción de los genes de las chaperoninas α y β , esto como respuesta a los factores de afección térmica y viral.



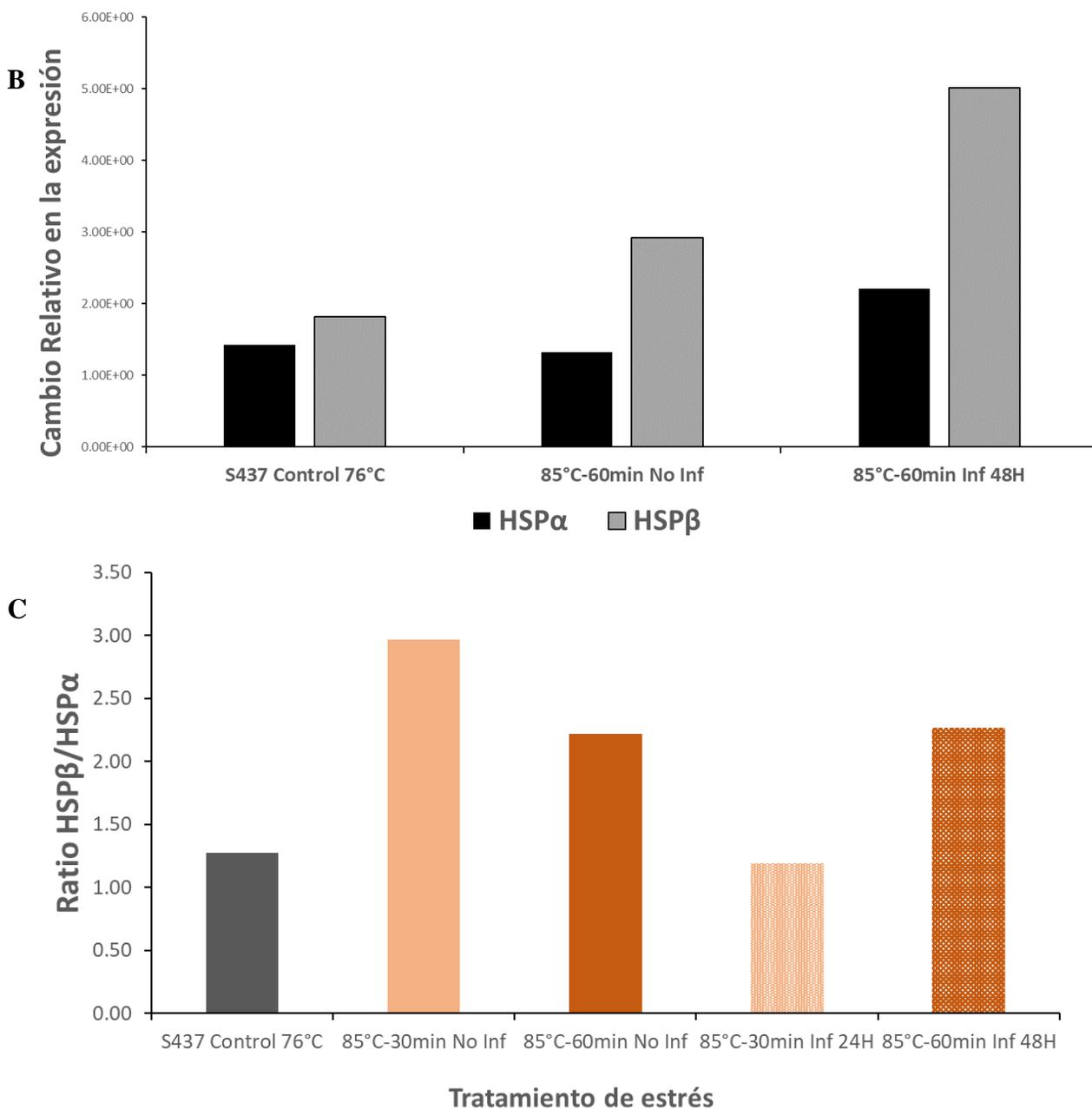


Figura 48. Cuantificación relativa de las transcripciones del gen HSP α y HSP β en *Sulfolobus solfataricus* P2 infectado con SSV8 y en condición de choque térmico. A.) Al presentarse un evento estresante por choque térmico de 85 °C por 30 y 60 minutos a células infectadas con SSV8, la transcripción de los genes HSP α y HSP β sugirió una sobreexpresión de proteínas de choque térmico en relación con el control no infectado y a temperatura de 76 °C. En este caso, ambas subunidades HSP α y HSP β mostraron un comportamiento al alza en contraste con otros episodios de estrés probados en esta investigación. La ratio entre los genes que codificaron cada subunidad estableció la prevalencia al alza de HSP β sobre HSP α en células infectadas con SSV8 y luego sometidas a choque térmico, así, se destacó el alto nivel de transcripción de HSP α a 85 °C por 30 minutos después de 24 HPI.

5 Discusión

5.1 Comportamiento de *Sulfolobus solfataricus* P2 y expresión de las HSP ante escenarios de estrés térmico y viral por SSV8

La efectividad del proceso de infección se probó a través de los ensayos de formación de halos para cada periodo postinfección, de este modo, la titulación efectuada cada 24 horas mostró una efectiva tasa de producción viral. Para la inoculación, se usó una concentración de $5,44 \times 10^7$ células/mL y, al finalizar las 96 horas postinfección, la concentración se ubicó en $5,51 \times 10^8$ células/mL. Lo anterior demostró una infección productiva por parte de SSV8 al huésped *Sulfolobus solfataricus* P2; estos datos promedio se obtuvieron a partir de los experimentos realizados de manera independiente.

El virus SSV8 se seleccionó por presentar una infección de carácter no lítico y un crecimiento arquetípico (Ceballos et al., 2020), así, la inhibición del crecimiento celular en los cultivos infectados tratados generó una disminución en los tiempos de las fases exponencial y estacionaria, esto en comparación con las fases del control. Por ello, se constató una disminución de la población de *Sulfolobus solfataricus* P2 frente a la población control no infectada en los mismos intervalos de tiempo. Por otro lado, las curvas de crecimiento permitieron establecer que el comportamiento de las células de *Sulfolobus solfataricus* P2 en las diferentes fases de crecimiento (exponencial, estacionaria y muerte) tuvo marcadas diferencias cuando el estrés fue causado por choque térmico y por infección viral.

En este sentido, en algunas investigaciones previas, el comportamiento por estrés térmico se había estudiado hasta la fase exponencial, no obstante, en la presente tesis se evaluó el estrés térmico hasta la fase de muerte, con el fin de evaluar el ciclo completo de estrés en *Sulfolobus solfataricus* P2 y comparar dicho ciclo en el estrés inducido por SSV8.

En el choque térmico a 80 °C, las diferencias no fueron evidentes, puesto que esta temperatura ha sido reportada dentro de los niveles naturales del hábitat de *Sulfolobus solfataricus* P2 (Guagliardi et al., 1994; Li et al., 2012; Yaoi et al., 2004). Por el contrario, en cuanto a las células afectadas por infección con SSV8, las fases de crecimiento estuvieron presentes, pero mantuvieron una regularidad limitada y reducida por la inhibición del virus, esto en comparación con el control no infectado.

A 85 °C, el estrés térmico afectó la fase estacionaria en dos fases de leve incremento y otras de decrecimiento antes de iniciar la fase de muerte celular; esta bifase estacionaria de las células expuestas a choque térmico se presentó por cerca de 50 horas frente a 24 horas del control no expuesto a choque térmico. Igualmente, a 90 °C, el estrés al que fueron sometidas las células produjo un corte abrupto en la fase exponencial y una ausencia de la fase estacionaria, lo que aceleró y pasó, directamente, a la fase de muerte celular a las 144 horas, esto en relación con el control a 76° C que llegó a las 192 horas.

Lo anterior indicó que, a pesar de que las HSP tuvieron una función adaptativa y de regulación a temperaturas superiores a 80 °C, esta se dio por periodos cortos (15-120 minutos) (Han et al., 1997; Kagawa et al., 1995; Trent et al., 1994; Trent, 1996), sin embargo, si hubieran sido superiores a más de 4 horas, los cambios hubieran sido letales en el ciclo de vida de las células. Esto contrasta con lo observado en las células infectadas que mantuvieron un comportamiento con sus fases de crecimiento, arquetipo similar a las células no infectadas, lo que sugirió una mayor estabilidad de las HSP en un estrés por infección viral, al menos, en el caso de *Sulfolobus solfataricus* P2 y SSV8; esto es de sumo interés, puesto que, en estudios posteriores, se deben evaluar las condiciones de infección en huéspedes de procedencia geográfica diferente y en condiciones de especiación (alopátrica y simpátrica) (Ceballos et al., 2020).

La función y el rol de las HSP han sido bien documentados en estudios sobre estrés por choque térmico en sulfolobales (Han et al., 1997; Roy et al., 2018; Trent, 1996; Trent et al., 2003; Yaoi et al., 2004), por otro lado, su presencia en otros tipos de estrés celular también ha sido referenciada como en el estrés oxidativo (Kort et al., 2013; McCarthy et al., 2016). La relación entre *Sulfolobus* y sus virus se ha enfocado en los procesos de resistencia y eficacia de la infección (Ceballos et al., 2020; Contursi et al., 2006; Prangishvili et al., 2001; Rice et al., 2001; Snyder et al., 2003; Stedman et al., 2003), y en la caracterización genética de virus y el huésped (Jaubert et al., 2013; Munson-Mcgee et al., 2018; Stedman et al., 1999).

No obstante, respecto con la presencia y la expresión HSP en el estrés causado por infección viral, no se reportó información y estudios previos para el caso de *Sulfolobus solfataricus* P2 con SSV8. Por esta razón, la presente investigación se centró en la identificación de los incrementos de las HSP identificados en las células sulfolobales ante fenómenos de estrés por infección viral.

El recorrido experimental realizado partió de los resultados de Kagawa et al. (1995) y Trent et al. (2003), donde los cultivos de *Sulfolobus shibatae* se sometieron a escenarios de estrés por choque térmico, lo que hizo evidente la sobreexpresión de HSP en esos eventos (Figura 2).

Para el caso de la presente investigación, se sometieron células de *Sulfolobus solfataricus* P2 a tres condiciones de estrés: (1) choque térmico (80 °C, 85 °C y 90 °C) durante tres periodos (15, 30 y 60 minutos) junto con un cultivo de control (76 °C); (2) infección por SSV8 y seguimiento postinfección cada 24 horas para los cultivos infectados y el control sin infección; (3) ensayos de choque térmico a 85 °C por 30 y 60 minutos a las 24 y 48 horas del proceso infectivo, esto junto con un control en condiciones de no estrés térmico ni por infección.

A estos grupos de células de *Sulfolobus solfataricus* P2 se les evaluó la presencia y la producción de las HSP en los diferentes tratamientos, esto mediante la visualización y la cuantificación de HSP en geles (PAGE), la concentración proteica con el ensayo de Bradford y la determinación de los niveles de RNA mensajero de las subunidades HSP α y HSP β (RT-q PCR), con el fin de identificar las respuestas de *Sulfolobus* ante tres episodios de estrés.

En relación con el choque térmico, los resultados coincidieron con lo reportado en investigaciones previas para este tipo de estrés (Kagawa et al., 1995; Trent, 1996). Así, los niveles de HSP presentaron incrementos considerables y evidentes cuando las células sulfobales eran sometidas al estrés térmico, esto en contraste con las células de control no expuestas al choque de calor.

Los geles obtenidos en PAGE en los ensayos donde *Sulfolobus solfataricus* P2 fue infectado con SSV8 presentaron una intensidad mayor en las bandas de muestras de células infectadas frente a las de control no infectado, lo que fue consecuencia de un posible incremento en proteínas de choque térmico ante la infección. Esto último representó una constante en las réplicas obtenidas en los experimentos independientes bajo los mismos procedimientos metodológicos, lo que fue respaldado con los resultados de análisis densitométrico, donde la densidad relativa de HSP en los geles fue mayor a los respectivos controles. Para determinar que la mayor intensidad de las bandas era generada por el aumento de HSP en los tratamientos de células infectadas por SSV8, se evaluó la concentración proteica con el ensayo de Bradford después del proceso de purificación de proteínas termoestables del lisado a 92 °C por 30 minutos.

Los datos obtenidos mostraron incrementos en la concentración proteica en los cultivos infectados, gradualmente, cada 24 horas, esto en comparación con el control no infectado con diferencias promedio de 2,38 $\mu\text{g/mL}$ frente a los cultivos no infectados.

5.2 Niveles de transcripción de los genes HSP α y HSP β en estrés viral por SSV8 en *Sulfolobus solfataricus* P2

La transcripción de los genes HSP α y HSP β en las primeras 24 HPI a 76 °C fue menor a la expresada en el control no infectado. De este modo, a las 48 HPI, la transcripción de los genes de las proteínas de choque térmico en condiciones de infección se aproximó al control, sin embargo, se tuvo en cuenta que la población infectada fue menor a la población control de acuerdo con el comportamiento observado en el AUC (Figura 35, B). Por lo tanto, se sugirió que un menor número de células sulfolobales en presencia de un factor viral expresaron HSP α y HSP β , esto en igual proporción que un mayor número de células no sometidas a ningún factor estresante; lo anterior permitió inferir que hubo una sobreexpresión de chaperoninas cuando las células de *Sulfolobus solfataricus* P2 se sometieron a infección por SSV8 (Figura 47), no obstante, es necesario realizar más replicas que ayuden a validar los datos encontrados.

Por otra parte, en los periodos (24 y 48 horas) de la postinfección, la expresión del gen HSP α fue menor que HSP β (Figura 47). La condición de estrés térmico que tuvo mayor expresión fue la de 85 °C por 30 y 60 minutos, por ello, *Sulfolobus solfataricus* P2 se sometió a una doble condición de estrés: choque térmico 85 °C + infección viral, con la finalidad de analizar los niveles de mRNA de las chaperoninas HSP α y HSP β ; se sugirió una posible sobreexpresión en comparación con el control no infectado y no sometido a choque térmico. En ambos casos, se evidenció más transcripción en células infectadas sometidas a choque térmico que en células no infectadas, lo que tuvo sentido al considerar que la renovación del mRNA y la síntesis de proteínas se podrían haber completado.

Este incremento de HSP en condiciones de infección viral pudo ser el resultado de la acumulación de una gran cantidad de proteínas liberadas por el virus, las que quedan presentes en el citoplasma de *Sulfolobus solfataricus* P2, así, son desplegadas en esta área celular y en potencial acción de agregación o aglomeración al estar las señales de producción de HSP α y HSP β .

Esta condición “activaría” para controlar esas potenciales aglomeraciones de proteínas en el huésped, lo que cumpliría su función de plegamiento y regulación de proteínas en la célula. Bajo dicha perspectiva, surgió un cuestionamiento frente a la manera en la que ese posible aumento de proteínas virales y proteínas del huésped en el citoplasma activaría la respuesta de expresión de las HSP de manera ambigua y sin tener en cuenta el origen de estas.

5.3 Potenciales causas de la alta regulación de HSP en *Sulfolobus solfataricus* P2 por infección viral causada por SSV8

Con el caso de la doble condición de estrés (choque térmico 85 °C + infección viral por SSV8), se dio un respaldo a esta posible acción, puesto que, al generarse el incremento natural por estrés térmico, sumado esto con la presencia de proteínas de origen viral, la demanda de producción de HSP fue sobrerregulada y expresada a un nivel alto en HSP α y HSP β . Sin duda, esto explicó el motivo por el que la sobreexpresión se dio a un nivel alto en ambas chaperoninas.

Dentro de las funciones alternas que se han reportado de las HSP, está la de protección y acompañamiento a las nuevas proteínas y a las recién plegadas para evitar su desnaturalización durante los episodios de estrés, por ello, estos incrementos de las HSP actúan como una potencial respuesta de defensa celular o inmunitaria primaria (Hightower, 1991) de *Sulfolobus solfataricus* P2 frente a la infección por SSV8. Esto podría ser consecuencia de una acción por parte de los virus, en vista de que estos pueden provocar daño celular debido al mal plegamiento, la degradación y la agregación insoluble de proteínas de la célula, así, las HSP podrían actuar como “reparadores” de esos sistemas proteicos.

Por otra parte, se ha planteado que los complejos de chaperoninas del grupo II (HSP60) pueden formar redes de estructuras filamentosas similares al citoesqueleto en bacteria y *eukarya* en la superficie intracelular de la membrana en sulfobales, con el fin de mantener la forma y la estabilidad celular (Trent et al., 2003). El resultado obtenido en esta tesis señaló que *Sulfolobus* genera una alta expresión de HSP ante el estrés viral y el ingreso de proteínas virales, donde, posiblemente, se presenta un uso de la maquinaria celular por parte del virus para plegar las proteínas virales (Figura 49) a través del termosoma proteico, el que es conformado por la subunidad HSP β que predomina en la formación de los complejos al igual que en el estrés térmico.

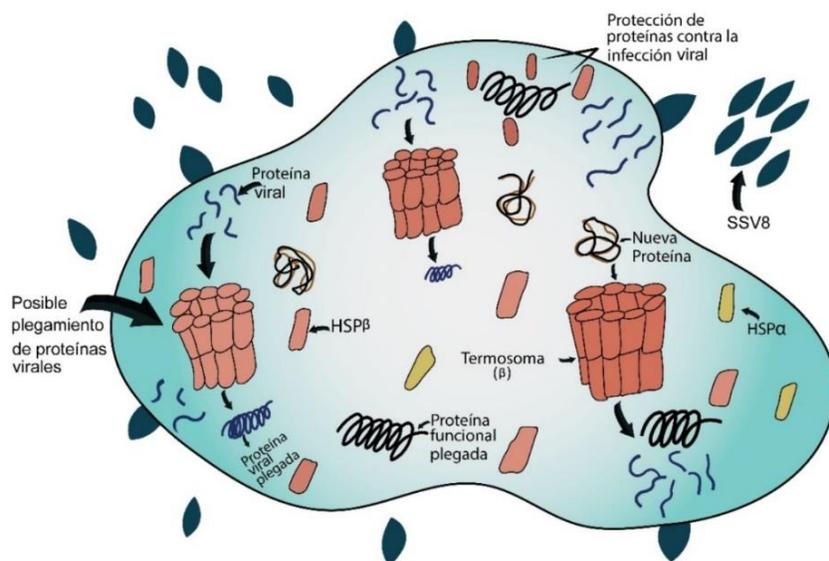


Figura 49. Representación de la respuesta sugerida de las HSP en la célula de *Sulfolobus* ante el estrés por infección viral con SSV8. *Sulfolobus* genera una alta expresión de HSP. Ante el ingreso de proteínas, se presentó un uso de la maquinaria celular por parte del virus para plegar las proteínas virales a través del termosoma proteico, conformado este por la subunidad HSP β que predomina en la formación de los complejos al igual que en el estrés térmico.

La sobrerregulación de HSP en los episodios de estrés viral podría tener un punto de conexión con lo descrito, puesto que, al momento del ingreso del virus a la célula, se generó la adsorción y la penetración por endocitosis, donde se puede producir una afección temporal de la membrana celular; esto último conllevaría a que esta estructura citoesquelética conformada por HSP sufriera una disrupción o fragmentación, por consiguiente, se presentaría una recuperación inmediata de estas estructuras para mantener la estabilidad de la célula. De igual manera, esto se evidenciaría al momento de la expulsión por gemación no lítica de los viriones, lo que generaría el incremento de las HSP ante la constante afección de la membrana.

Es preciso tener en cuenta que una posible coevolución del huésped (alopátrico y simpátrico) y el virus pudo dar, como resultado, una membrana celular en el huésped, esta con características de menor o mayor resistencia a los mecanismos de adsorción y penetración del virus en la superficie de la membrana, por esto, se facilitaría la gemación o la lisis celular según el caso (Ceballos et al., 2020). Sin embargo, se requieren más estudios para determinar si en la fase de multiplicación

de los viriones en el citoplasma celular estos hacen uso de las HSP del huésped para formar la estructura viral.

La inducción de HSP pudo ser el resultado indirecto de la rápida acumulación de una gran cantidad de proteínas virales presentes en el núcleo y el citoplasma de la célula huésped, lo que daría como resultado que HSP60 secuestrara y liberara HSF para la transcripción del gen de choque térmico. De esto surgió otra cuestión sobre la actuación de SSV8 y otros tipos de virus SSV en las diferentes especies de *Sulfolobus*, es decir, su posible capacidad de “secuestrar” la maquinaria de las chaperoninas para usarla como herramienta en el correcto plegamiento de las proteínas virales, así como para su correcto ensamblaje en componentes y estructuras durante las diferentes fases del ciclo de replicación de los viriones.

Con los datos obtenidos, fue posible sugerir que los niveles de expresión de las HSP sí presentan una sobrerregulación en presencia de un factor estresante viral, al menos, respecto con *Sulfolobus solfataricus* P2 al ser infectado con SSV8.

Por lo tanto, la hipótesis principal resultó ser verdadera de acuerdo con los resultados obtenidos, en virtud de que se encontró una significativa concentración proteica durante los periodos de la postinfección. En este aumento de proteínas pudo haber proteínas de origen viral, pero la expresión de HSP α y HSP β sugirió una producción de proteínas de choque térmico alta en comparación con células no infectadas, esto respaldado por los resultados alcanzados luego de la purificación de proteínas termoestable (Figura 37).

Análogamente, se destaca lo encontrado en la transcripción de las dos chaperoninas HSP α y HSP β en presencia de dos factores estresantes: el térmico y el viral, lo que fue más significativo en los experimentos realizados en contraste con los eventos de estrés térmico y viral por separado; se tuvo una llamativa sobreexpresión de ambas chaperoninas no reportada en eventos de estrés térmico.

La “estabilidad” al estrés, propuesta también en la hipótesis, se reflejó en los niveles de expresión de HSP pasados los 30 minutos del choque térmico y las 72 horas para la infección por SSV8, donde estos se redujeron, pero mantuvieron diferencias al alza frente a los controles. Así, los resultados revelaron que la célula de *Sulfolobus*, ante dos eventos de estrés, genera altos niveles de expresión de HSP y aumenta la potencial formación del termosoma, compuesto de las

dos subunidades HSP α y HSP β (Figura 50); esto mostró una alta resistencia y funcionalidad de las HSP en otros escenarios estresantes en este organismo.

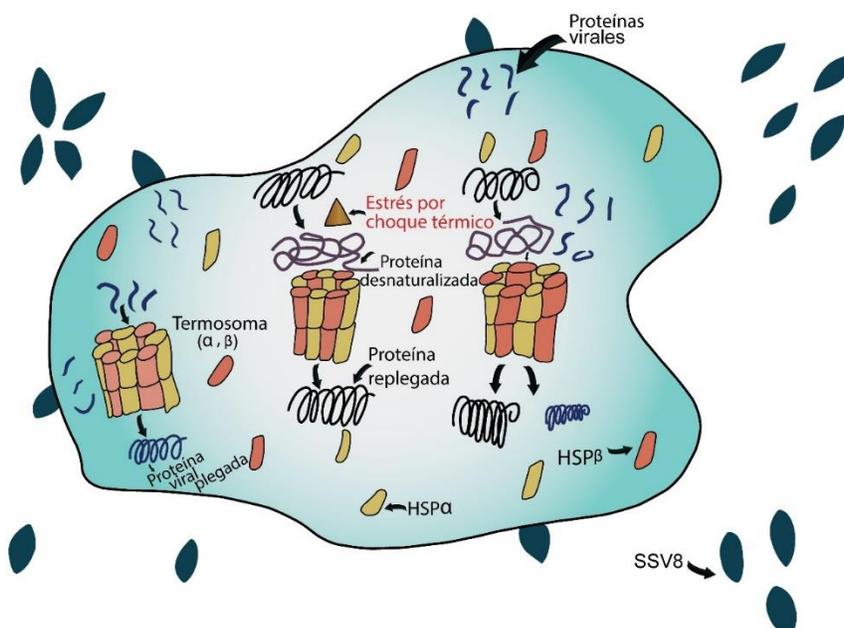


Figura 50. Representación de la respuesta sugerida de las HSP en la célula de *Sulfolobus* ante estrés por choque térmico a células infectadas con SSV8. La célula de *Sulfolobus*, ante dos eventos de estrés, genera altos niveles de expresión de HSP y aumenta la potencial formación de termosomas, compuestos de las dos subunidades HSP α y HSP β . Esto sugirió una alta resistencia y funcionalidad de las HSP ante otros escenarios estresantes en este organismo.

En este orden de ideas, la segunda hipótesis planteada estableció que los niveles de expresión de las HSP con otras fuentes de estrés en *Sulfolobus* eran los mismos producidos cuando la causa es el estrés por choque térmico; esto se confirmó al evaluar los resultados en los tres tipos de estrés a los que se sometió *Sulfolobus solfataricus* P2 (térmico, viral y combinado). Asimismo, los niveles de expresión de las HSP incrementaron cuando las células sufrieron episodios de estrés por causa de choque térmico, lo que se determinó al comparar células control que no fueron sometidas a las condiciones estresantes.

En los tratamientos de estrés térmico (80 °C, 85 °C y 90 °C) realizados en esta investigación, fue posible evidenciar que los niveles de concentración y expresión proteica fueron mayores que los

controles a 76 °C, puesto que se destacó una mayor diferencia en el estrés térmico a 85 °C por 30 minutos. Los resultados en PAGE, el ensayo de Bradford y el RT- qPCR fueron coincidentes con lo planteado por Kagawa et al. (1995) y Trent et al. (2003), de esta manera, se validaron los protocolos de procedimiento para contrastar los resultados por estrés viral y combinado.

En las células sulfobales infectadas con SSV8, la concentración de proteínas termoestables obtenidas por el ensayo de Bradford mostró un incremento de ~10 µg/mL en comparación con los experimentos de choque térmico; lo anterior en consideración de que estos incrementos de proteínas pueden deberse a la presencia de proteínas de origen viral.

Por esta razón, para descartar la posible influencia de proteínas virales, los niveles de transcripción de los genes HSP α y HSP β señalaron que, a medida que la infección avanzaba, estos eran más altos en la fase exponencial del crecimiento de las células (24 y 48 horas), en específico, a las 48 HPI, donde los niveles de expresión proteica de los cultivos infectados fueron, aproximadamente, iguales a los no infectados.

El nivel de expresión de HSP en el estrés de choque térmico a células infectadas mantuvo el mismo patrón de incremento frente al control, donde resaltaron, considerablemente, los altos niveles de transcripción de HSP α y HSP β a una temperatura de 85 °C, así como un tiempo de estrés por 30 y 60 minutos frente a los escenarios donde las células no infectadas se sometieron a estrés térmico y al control a 76°C.

Respecto con la tercera hipótesis, al comparar la expresión de las subunidades HSP α y HSP β en *Sulfolobus solfataricus* P2, esto para cada uno de los factores de estrés realizados en esta investigación, se identificó que, en los tratamientos por choque térmico e infección viral con SSV8, predominó una mayor transcripción de genes HSP β sobre HSP α , incluso, en los cultivos de control a 76 °C. Esto sugirió que no existirían cambios significativos en cómo ambas chaperoninas se expresan ante eventos de estrés, pues el complejo HSP β tiene una mayor adaptabilidad a altas temperaturas (Chaston et al., 2016; Trent et al., 2003; Yaoi et al., 2004) y ante el estrés viral, incluso, en situaciones de estrés duales, debido a que, al someter a células infectadas al choque térmico, la expresión de ambas subunidades fue sobrerregulada, pero con mayor incremento en HSP β .

La alta transcripción del gen HSP β representó una constante al alza de la subunidad HSP β , igualmente, su diferencia en la ratio sobre HSP α estableció que la estequiometría del complejo proteico en la distribución de las subunidades que le conforman sufrió cambios generados por el estrés, fuera este por infección viral o choque térmico (Yamamoto y Yohda, 2016).

Esta prevalencia de subunidad HSP β pudo estar relacionada con la interacción que las regiones terminales N- y C- de esta proteína tienen con la protuberancia helicoidal del termosoma, lo que brindaría una mayor estabilidad para mantener la cavidad termosomal ante las condiciones de cambio y continuar con las funciones de plegamiento proteico, esto según estudios realizados en los sistemas pre-plegamiento del termosoma en *Pyrococcus* y *Thermococcus spp*, donde HSP β también está en alta regulación (Garbuz, 2017; Yamamoto y Yohda, 2016).

En este sentido, es conveniente aclarar que esto debe ser complementado por estudios posteriores que permitan asegurar las observaciones iniciales aquí reportadas. En suma, se realizaron experimentos de estrés viral con SSV8 con *Sulfolobus islandicus* (S200) y *Sulfolobus sp Russian strain* (S150), así, los resultados (no mostrados en este escrito) en las SDS-PAGE fueron similares a los reportados con *Sulfolobus solfataricus* P2 (S437).

6 Conclusiones

Los resultados obtenidos en los experimentos desarrollados para determinar la regulación de las proteínas de choque térmico en *Sulfolobus solfataricus* P2 ante estrés por infección viral con SSV8 señalaron lo siguiente.

- (1) Dentro de las especies del género *Sulfolobus*, se encuentra *Sulfolobus solfataricus* P2 y se reporta como novedad en esta investigación una respuesta regulatoria positiva a la elevada regulación de HSP en estrés causado por infección viral por SSV8. Este incremento se encontró en las diferentes fases de crecimiento de la interacción huésped-virus, lo que fue evidente entre las 24 y 48 HPI correspondientes con la fase exponencial dentro de la postinfección.
- (2) Los niveles de expresión de las proteínas de choque térmico que se presentaron en *Sulfolobus solfataricus* P2 ante la infección por SSV8 fueron equivalentes con los experimentados por estas células ante el estrés por incremento de temperatura.
- (3) Las subunidades de HSP α y HSP β presentaron un comportamiento de expresión similar al de estrés térmico, esto con una alta predominancia de la ratio de los genes de HSP β sobre los de HSP α . Esto sugiere que la variación en la distribución estequiométrica de las subunidades que conforman el termosoma en condiciones de estrés por choque térmico también se presenta en las células sulfolobales como respuesta regulatoria ante el estrés viral por SSV8. Así como la recuperación a un estado previo al estrés.
- (4) La disminución repentina en la expresión de HSP al principio de la infección de SSV8 en *Sulfolobus solfataricus* P2 sugiere que los recursos metabólicos del huésped se han redirigido; sin embargo, más adelante en el ciclo de la infección, la expresión de HSP celular se recupera.

6.1 Conclusions

The results obtained in the experiments developed to determine the regulation of heat shock proteins in *Sulfolobus solfataricus* P2 under stress due to viral infection with SSV8 indicated the following:

- (1) Among the species of the genus *Sulfolobus*, *Sulfolobus solfataricus* P2 is found and a positive regulatory response to up-regulation of HSP in stress caused by SSV8 viral infection is reported as a novelty in this research. This increase was found at different growth phases of host-virus interaction, which was evident between 24 and 48 HPI corresponding with the exponential phase within post infection.
- (2) The expression levels of heat shock proteins that occurred in *Sulfolobus solfataricus* P2 upon SSV8 infection were equivalent to those experienced by these cells upon increased temperature stress.
- (3) HSP α and HSP β subunits presented similar expression behavior upon heat stress, this with a high predominance of the ratio of genes HSP β over the other HSP α chaperonin. This suggests that variation in the stoichiometric distribution of subunits that form the thermosome under heat shock stress conditions is also present in *Sulfolobus* cells as a regulatory response to viral stress by SSV8. As well as recovery to a pre-stress condition.
- (4) The sudden decrease in HSP expression at the beginning of SSV8 infection in *Sulfolobus solfataricus* P2 suggests that host metabolic resources have been redirected; however, further along in the infection cycle, cellular HSP expression recovers.

6.2 Futuras investigaciones

El presente estudio permitió formular la siguiente pregunta ¿Cuál es el papel que juegan las proteínas de choque térmico en el control de la replicación de los virus SSV en los sulfolobales?

En este orden de ideas, se espera que en estudios posteriores se consideren las características de los diferentes tipos de virus (SSV) y su manera específica de infección con los distintos huéspedes a nivel geográfico, con un análisis de cómo pueden actuar en diferentes niveles en la cascada de eventos que conducen a la expresión y la acumulación de HSP, así como el uso que los virus hacen del sistema proteico del huésped en su beneficio metabólico y reproductivo.

Así como también establecer si existe una manera específica de expresión de las HSP en otros episodios de alteración del equilibrio celular en *Sulfolobus*.

7 Bibliografía

- Ahmad, M., Tahir, A., & Anjum, R. (2020). Heat stability of proteins and its exploitation for purification of heat-stable proteins. *Preprints*, 1-14. <https://doi.org/10.20944/preprints202008.0225.v1>
- Andra, S., Frey, G., Jaenicke, R., & Stetter, K. O. (1998). The thermosome from methanopyrus kandleri possesses an NH₄⁺-dependent ATPase activity. *European Journal of Biochemistry*, 255(1), 93-99. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2550093.x>
- Archibald, J. (1999). Recurrent paralogy in the evolution of archaeal chaperonins. *Current Biology*, 70(1), 12-13. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1964.tb01960.x>
- Arya, R., Mallik, M., & Lakhotia, S. C. (2007). Heat shock genes - integrating cell survival and death. *Journal of Biosciences*, 32(3), 595-610. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0059-3>
- Baes, R., Lemmens, L., Mignon, K., Carlier, M., & Peeters, E. (2020). Defining heat shock response for the thermoacidophilic model crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Extremophiles*, 24(5), 681-692. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01184-y>
- Baker, B., de Anda, V., Seitz, K., Dombrowski, N., Santoro, A., & Lloyd, K. (2020). Diversity, ecology and evolution of Archaea. *Nature Microbiology*, 5, 887-900. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0715-z>
- Bakthisaran, R., Tangirala, R., & Rao, C. (2015). Small heat shock proteins: role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1854(4), 291-319. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>
- Bath, C., & Dyall-Smith, M. (1998). His1, an Archaeal virus of the Fuselloviridae family that infects *Haloarcula hispanica*. *Journal of Virology*, 72(11), 9392-9395. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.9392-9395.1998>
- Bautista, M., Zhang, C., & Whitaker, R. (2015). Virus-induced dormancy in the archaeon *Sulfolobus islandicus*. *MBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02565-14>

- Beblo, K., Douki, T., Schmalz, G., Rachel, R., Wirth, R., Huber, H., Reitz, G., & Rettberg, P. (2011). Survival of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms after exposure to UV-C, ionizing radiation and desiccation. *Archives of Microbiology*, *193*(11), 797-809. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0718-5>
- Beblo, K., Rabbow, E., Rachel, R., Huber, H., & Rettberg, P. (2009). Tolerance of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms to desiccation. *Extremophiles*, *13*(3), 521-531. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0239-1>
- Berkner, S., & Lipps, G. (2008). Mutation and reversion frequencies of different *Sulfolobus* species and strains. *Extremophiles*, *12*(2), 263-270. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0125-7>
- Berliner, A., Mochizuki, T., & Stedman, K. (2018). Astrovirology: viruses at large in the universe. *Astrobiology*, *18*(2), 207-223. <https://doi.org/10.1089/ast.2017.1649>
- Bernander, R. (2007). The cell cycle of *Sulfolobus*. *Molecular Microbiology*, *66*(3), 557-562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05917.x>
- Bigotti, M., & Clarke, A. (2005). Cooperativity in the thermosome. *Journal of Molecular Biology*, *348*(1), 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.01.066>
- Bigotti, M., & Clarke, A. (2008). Chaperonins: the hunt for the Group II mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *474*(2), 331-339. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.015>
- Bischof, L., Haurat, M., Hoffmann, L., Albersmeier, A., Wolf, J., Neu, A., Pham, T., Albaum, S. P., Jakobi, T., Schouten, S., Neumann-Schaal, M., Wright, P., Kalinowski, J., Siebers, B., & Albers, S. (2019). Early response of *Sulfolobus acidocaldarius* to nutrient limitation. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 3201. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03201>
- Bize, A., Karlsson, E., Ekefjård, K., Quax, T., Pina, M., Prevost, M., Forterre, P., Tenailon, O., Bernander, R., & Prangishvili, D. (2009). A unique virus release mechanism in the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(27), 11306-11311. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901238106>

- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H., & Stetter, K. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 °C. *Extremophiles*, 1(1), 14-21. <https://doi.org/10.1007/s007920050010>
- Booth, I. (2002). Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2), 19-30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12222634>
- Borges, J., & Ramos, C. (2005). Protein Folding assisted by chaperones. *Protein & Peptide Letters*, 12(3), 257-261. <https://doi.org/10.2174/0929866053587165>
- Braun, T., Orlova, A., Valegård, K., Lindås, A., Schröder, G., & Egelman, E. (2015). Archaeal actin from a hyperthermophile forms a single-stranded filament. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), 9340-9345. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509069112>
- Brock, T., Brock, K., Belly, R., & Weiss, R. (1972). Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv Für Mikrobiologie*, 84(1), 54-68. <https://doi.org/10.1007/BF00408082>
- Bross, P. (2015). *The Hsp60 Chaperonin*. Springer.
- Bukau, B., & Horwich, A. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351-366. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80928-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80928-9)
- Cady, L., Brack, A., Bueno, J., Cockell, C., Horneck, G., Kasting, J., Lineweaver, C., Raulin, F., Schopf, J., Sleep, N., Von Bloh, W., Westall, F., Deamer, D., Lehman, N., & Pérez-Mercader, J. (2014). Where do we go from here? Astrobiology editorial board opinions. *Astrobiology*, 14(8), 629-644. <https://doi.org/10.1089/ast.2014.1405>
- Cavagnero, S., Zhou, Z., Adams, M., & Chan, S. (1995). Response of Rubredoxin from *Pyrococcus furiosus* to environmental changes: implications for the origin of Hyperthermostability. *Biochemistry*, 34(31), 9865-9873. <https://doi.org/10.1021/bi00031a007>
- Cavicchioli, R. (2007). *Archaea: molecular and cellular biology*. ASM Press.

- Cavicchioli, R., Thomas, T., & Curmi, P. (2000). Cold stress response in Archaea. *Extremophiles*, 4(6), 321-331. <https://doi.org/10.1007/s007920070001>
- Ceballos, M., Marceau, C., Marceau, J., Morris, S., Clore, A., & Stedman, K. (2012). Differential virus host-ranges of the Fuselloviridae of hyperthermophilic Archaea: implications for evolution in extreme environments. *Frontiers in Microbiology*, 3(AUG), 295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00295>
- Ceballos, M., Drummond, C., Stacy, C., Padilla-Crespo, E., & Stedman, K. (2020). Host-dependent differences in replication strategy of the sulfolobus spindle-shaped virus strain SSV9 (a.k.a., SSVK1): infection profiles in hosts of the family Sulfolobaceae. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1218. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01218>
- Chaston, J., Smits, C., Aragão, D., Wong, A., Ahsan, B., Sandin, S., Molugu, S., Molugu, S., Bernal, R., Stock, D., & Stewart, A. (2016). Structural and functional insights into the evolution and stress adaptation of Type II Chaperonins. *Structure*, 24(3), 364-374. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.12.016>
- Chen, L., Brügger, K., Skovgaard, M., Redder, P., She, Q., Torarinsson, E., Greve, B., Awayez, M., Zibat, A., Klenk, H., & Garrett, R. (2005). The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the Crenarchaeota. *Journal of Bacteriology*, 187(14), 4992-4999. <https://doi.org/10.1128/JB.187.14.4992-4999.2005>
- Contursi, P., Jensen, S., Aucelli, T., Rossi, M., Bartolucci, S., & She, Q. (2006). Characterization of the *Sulfolobus* host-SSV2 virus interaction. *Extremophiles*, 10(6), 615-627. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0017-2>
- Cuéllar, J. (2008). *Caracterización estructural y funcional de la interacción entre las chaperonas CCT y HSC70 [Tesis doctoral]*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- De Vendittis, E., & Bocchini, V. (1996). Protein-encoding genes in the sulfothermophilic archaea *Sulfolobus* and *Pyrococcus*. *Gene*, 176(1-2), 27-33. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00203-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00203-X)

- Delong, E. (1998). Everything in moderation: Archaea as “non-extremophiles”. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8(6), 649-654. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80032-4](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80032-4)
- DeYoung, M., Thayer, M., van der Oost, J., & Stedman, K. (2011). Growth phase-dependent gene regulation in vivo in *Sulfolobus solfataricus*. *FEMS Microbiology Letters*, 321(2), 92-99. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02313.x>
- Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Stetter, K., Huber, H., Huber, R., & Steinbacher, S. (1998). Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell*, 93(1), 125-138. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81152-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81152-6)
- Elferink, M., De Wit, J., Demel, R., Driessen, A., & Konings, W. (1992). Functional reconstitution of membrane proteins in monolayer liposomes from bipolar lipids of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(2), 1375-1381. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48441-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48441-4)
- Elkins, J., Podar, M., Graham, D., Makarova, K., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M., & Stetter, K. (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 105(23), 8102-8107. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801980105>
- Ellis, J. (1997). The chaperonins. *Cell Stress & Chaperones*, 2(1). [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(1997\)002<0072:tc>2.3.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1997)002<0072:tc>2.3.co;2)
- Ellis, M., Knapp, S., & Hebert, H. (1998). Two-dimensional crystallization of the chaperonin TF55 from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Structural Biology*, 123(1), 30-36. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4002>
- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C., & Ettema, T. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 711-723. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.133>

- Feder, M., & Hofmann, G. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, *61*, 243-282. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>
- Forterre, P. (2006). The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Research*, *117*(1), 5-16. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.010>
- Forterre, P., Brochier, C., & Philippe, H. (2002). Evolution of the Archaea. *Theoretical Population Biology*, *61*(4), 409-422. <https://doi.org/10.1006/tpbi.2002.1592>
- Forterre, P., & Prangishvili, D. (2009). The origin of viruses. *Research in Microbiology*, *160*(7), 466-472. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.07.008>
- Furutani, M., Iida, T., Yoshida, T., & Maruyama, T. (1998). Group II chaperonin in a thermophilic methanogen, methanococcus thermolithotrophicus: chaperone activity and filament-forming ability. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(43), 28399-28407. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.28399>
- Garbuz, D. G. (2017). Regulation of heat shock gene expression in response to stress. In *Molecular Biology* (Vol. 51, Issue 3, pp. 352–367). Maik Nauka Publishing / Springer SBM. <https://doi.org/10.1134/S0026893317020108>
- Gill, S., Catchpole, R., & Forterre, P. (2019). Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(3), 273-303. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy042>
- Gómez-Puertas, P., Martín, J., Carrascosa, L., Willison, K., & Valpuesta, J. (2004). *The substrate recognition mechanisms in chaperonins*, *17*(2), 85-94. <https://doi.org/10.1002/jmr.654>
- Goodman, D., & Stedman, K. (2018). Comparative genetic and genomic analysis of the novel fusellovirus *Sulfolobus* spindle-shaped virus 10. *Virus Evolution*, *4*(2). <https://doi.org/10.1093/ve/vey022>
- Gribaldo, S., & Brochier-Armanet, C. (2006). The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *361*(1470), 1007-1022. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1841>

- Gristwood, T., Duggin, I., Wagner, M., Albers, S., & Bell, S. (2012). The sub-cellular localization of *Sulfolobus* DNA replication. *Nucleic Acids Research*, *40*(12), 5487-5496. <https://doi.org/10.1093/nar/gks217>
- Groussin, M., & Gouy, M. (2011). Adaptation to environmental temperature is a major determinant of molecular evolutionary rates in archaea. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(9), 2661-2674. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr098>
- Guagliardi, A., Cerchia, L., Bartolucci, S., & Rossi, M. (1994). The chaperonin from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* promotes correct refolding and prevents thermal denaturation in vitro. *Protein Science*, *3*(9), 1436-1443. <https://doi.org/10.1002/pro.5560030910>
- Guagliardi, A., Cerchia, L., & Rossi, M. (1997). The chaperonin of the archaean *Sulfolobus solfataricus* a tool for applied biochemistry. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, *62*(1), 37-46. <https://doi.org/10.1007/BF02787982>
- Gutsche, I., Essen, L., & Baumeister, W. (1999). Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine. *Journal of Molecular Biology*, *293*(2), 295-312. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3008>
- Han, C., Park, S., & Kelly, R. (1997). Acquired thermotolerance and stressed-phase growth of the extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(6), 2391-2396. <https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2391-2396.1997>
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D., & Buchner, J. (2005). Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, *12*(10), 842-846. <https://doi.org/10.1038/nsmb993>
- Haslbeck, M., & Vierling, E. (2015). A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of Molecular Biology*, *427*(7), 1537-1548. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>

- Hayer-Hartl, M., Bracher, A., & Hartl, F. (2016). The GroEL-GroES chaperonin machine: a nano-cage for protein folding. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(1), 62-76. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.009>
- Held, N., & Whitaker, R. (2009). Viral biogeography revealed by signatures in *Sulfolobus islandicus* genomes. *Environmental Microbiology*, *11*(2), 457-466. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01784.x>
- Henneman, B., van Emmerik, C., van Ingen, H., Dame, R., & Levin, P. (2018). Structure and function of archaeal histones. *PLoS Genetics*, *14*(9), e1007582. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007582>
- Hightower, L. (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*, *66*(2), 191-197. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90611-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90611-2)
- Horwich, A., & Fenton, W. (2020). Chaperonin-assisted protein folding: a chronologue. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *53*, E4. <https://doi.org/10.1017/S0033583519000143>
- Horwich, A., Fenton, W., Chapman, E., & Farr, G. (2007). Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *23*(1), 115-145. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123555>
- Hunt, C., & Morimoto, R. (1985). Conserved features of eukaryotic HSP70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human HSP70 (gene structure/heat shock/evolution). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*, 6455-6459. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC390735/pdf/pnas00359-0097.pdf>
- Huo, Y., Hu, Z., Zhang, K., Wang, L., Zhai, Y., Zhou, Q., Lander, G., Zhu, J., He, Y., Pang, X., Xu, W., Bartlam, M., Dong, Z., & Sun, F. (2010). Crystal structure of group II chaperonin in the open state. *Structure*, *18*(10), 1270-1279. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.07.009>

- Iizuka, R., Sugano, Y., Ide, N., Ohtaki, A., Yoshida, T., Fujiwara, S., Imanaka, T., & Yohda, M. (2008). Functional characterization of recombinant prefoldin complexes from a Hyperthermophilic Archaeon, *Thermococcus* sp. Strain KS-1. *Journal of Molecular Biology*, 377(3), 972-983. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.070>
- Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osaea, S., & Miyata, T. (1989). *Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 9355-9359. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC298494/pdf/pnas00290-0313.pdf>
- Jaakkola, S., Ravantti, J., Oksanen, H., & Bamford, D. (2016). Buried alive: microbes from ancient halite. *Trends in Microbiology*, 24(2), 148-160. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.002>
- Jaubert, C., Danioux, C., Oberto, J., Cortez, D., Bize, A., Krupovic, M., She, Q., Forterre, P., Prangishvili, D., & Sezonov, G. (2013). Genomics and genetics of *Sulfolobus islandicus* LAL14/1, a model hyperthermophilic archaeon. *Open Biology*, 3, 130010. <https://doi.org/10.1098/rsob.130010>
- Kagawa, H., Osipiuk, J., Maltsev, N., Overbeek, R., Quaiter-Randall, E., Joachimiak, A., & Trent, J. (1995). The 60 kDa heat shock proteins in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *Journal of Molecular Biology*, 253(5), 712-725. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0585>
- Karlin, S., Mrázek, J., Ma, J., & Brocchieri, L. (2005). Predicted highly expressed genes in archaeal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(20), 7303-7308. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502313102>
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Jin-No, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Kato, Y., Yoshizawa, T., Tanaka, T., & Kikuchi, H. (2001). Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain. *DNA Research*, 8(4), 123-140. <https://doi.org/10.1093/dnares/8.4.123>

- Kendrick, M., & Kral, T. (2006). Survival of methanogens during desiccation: implications for life on Mars. *Astrobiology*, 6(4), 546-551. <https://doi.org/10.1089/ast.2006.6.546>
- Khayat, R., Tang, L., Larson, E., Lawrence, C., Young, M., & Johnson, J. (2005). Structure of an archaeal virus capsid protein reveals a common ancestry to eukaryotic and bacterial viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 18944-18949. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506383102>
- Klunker, D., Haas, B., Hirtreiter, A., Figueiredo, L., Naylor, D., Pfeifer, G., Müller, V., Deppenmeier, U., Gottschalk, G., Hartl, F., & Hayer-Hartl, M. (2003). Coexistence of group I and group II chaperonins in the archaeon *Methanosarcina mazei*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33256-33267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302018200>
- Knapp, S., Schmidt-Krey, I., Hebert, H., Bergman, T., Jörnvall, H., & Ladenstein, R. (1994). The molecular chaperonin TF55 from the Thermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Molecular Biology*, 242(4), 397-407. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1590>
- Kort, J., Esser, D., Pham, T., Noirel, J., Wright, P., & Siebers, B. (2013). A cool tool for hot and sour Archaea: proteomics of *Sulfolobus solfataricus*. *Proteomics*, 13(18-19), 2831-2850. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300088>
- Krupovic, M., Cvirkaite-Krupovic, V., Iranzo, J., Prangishvili, D., & Koonin, E. (2018). Viruses of archaea: structural, functional, environmental and evolutionary genomics. *Virus Research*, 244, 181-193. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.11.025>
- Kumar, C., Mande, S., & Mahajan, G. (2015). Multiple chaperonins in bacteria — novel functions and non-canonical behaviors. *Cell Stress and Chaperones*, 20(4), 55-574. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0598-8>
- Laksanalamai, P., & Robb, F. (2004). Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles*, 8(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0362-3>
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P., & Zillig, W. (1995). Transcription in Archaea: similarity to that in Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13), 5768-5772. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5768>

- Large, A., Goldberg, M., & Lund, P. (2009). Chaperones and protein folding in the archaea. *Biochemical Society Transactions*, 37(1), 46-51. <https://doi.org/10.1042/bst0370046>
- Larmony, S., Garnier, F., Hoste, A., & Nadal, M. (2015). A specific proteomic response of *Sulfolobus solfataricus* P2 to gamma radiations. *Biochimie*, 118, 270-277. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.014>
- Laskey, R., Honda, B., Mills, A., & Finch, J. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 275(5679), 416-420. <https://doi.org/10.1038/275416a0>
- Lawrence, C., Menon, S., Eilers, B., Bothner, B., Khayat, R., Douglas, T., & Young, M. (2009). Structural and functional studies of archaeal viruses. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12599-12603. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800078200>
- Leigh, J., Albers, S., Atomi, H., & Allers, T. (2011). Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, thermococcales and sulfolobales. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 577-608. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00265.x>
- Lemmens, L., Baes, R., & Peeters, E. (2018). Heat shock response in archaea. *Emerging Topics in Life Sciences*, 2(4), 581-593. <https://doi.org/10.1042/etls20180024>
- Lewalter, K., & Müller, V. (2006). Bioenergetics of archaea: ancient energy conserving mechanisms developed in the early history of life. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(5-6), 437-445. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.04.027>
- Li, D., Yang, F., Lu, B., Chen, D., & Yang, W. (2012). Thermotolerance and molecular chaperone function of the small heat shock protein HSP20 from hyperthermophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus* P2. *Cell Stress and Chaperones*, 17(1), 103-108. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0289-z>
- Liang, P., & MacRae, T. (1997). Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 110(Pt. 1), 1431-1440. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224761>
- Lin, Z., & Rye, H. (2006). GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4), 211-239. <https://doi.org/10.1080/10409230600760382>

- Lindquist, S., & Craig, E. (1988). The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22, 631-677. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>
- López-García, P., & Moreira, D. (2019). Eukaryogenesis, a syntrophy affair. *Nature Microbiology*, 4(7), 1068-1070. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0495-5>
- López, T., Dalton, K., & Frydman, J. (2015). The Mechanism and function of group II chaperonins. *Journal of Molecular Biology*, 427(18), 2919-2930. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.04.013>
- Macario, A., Brocchieri, L., Shenoy, A., & De Macario, E. (2006). Evolution of a protein-folding machine: genomic and evolutionary analyses reveal three lineages of the archaeal hsp70(dnaK) gene. *Journal of Molecular Evolution*, 63(1), 74-86. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-6207-1>
- Macario, A., Lange, M., Ahring, B., & Conway de Macario, E. (1999). Stress genes and proteins in the archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(4), 923-967. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585970>
- Macario, E., & Macario, A. (1994). Heat-shock response in Archaea. *Trends in Biotechnology*, 12(12), 512-518. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90059-0)
- Makarova, K., Yutin, N., Bell, S., & Koonin, E. (2010). Evolution of diverse cell division and vesicle formation systems in Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 731-741. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2406>
- Mansilla, M., Montalban, X., & Espejo, C. (2012). Heat shock protein 70: roles in multiple sclerosis. *Molecular Medicine*, 18, 1018-1028. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00119>
- Marco, S., Ureña, D., Carrascosa, J., Waldmann, T., Peters, J., Hegerl, R., Pfeifer, G., Sack-Kongehl, H., & Baumeister, W. (1994). The molecular chaperone TF55. Assessment of symmetry. *FEBS Letters*, 341(2-3), 152-155. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80447-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80447-8)

- McCarthy, S., Johnson, T., Pavlik, B., Payne, S., Schackwitz, W., Martin, J., Lipzen, A., Keffeler, E., & Blum, P. (2016). Expanding the limits of thermoacidophily in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* by adaptive evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(3), 857-867. <https://doi.org/10.1128/AEM.03225-15>
- McFadden, G. (1998). Even viruses can learn to cope with stress. *Science*, 279(5347), 40-41. <https://doi.org/10.1126/science.279.5347.40>
- Medina, N. (2019). *Diversidad y potencial biotecnológico del dominio Archaea en Cuatro Ciénegas, Coahuila [Tesis de doctorado]*. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Mega, R., Manzoku, M., Shinkai, A., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., & Masui, R. (2010). Very rapid induction of a cold shock protein by temperature downshift in *Thermus thermophilus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(3), 336-340. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.065>
- Menon, S, Eilers, B., Young, M., & Lawrence, C. (2010). The Crystal Structure of D212 from *Sulfolobus* Spindle-Shaped Virus Ragged Hills Reveals a New Member of the PD-(D/E)XK Nuclease Superfamily. *Journal of Virology*, 84(12), 5890-5897. <https://doi.org/10.1128/jvi.01663-09>
- Merino, N., Aronson, H., Bojanova, D., Feyhl-Buska, J., Wong, M., Zhang, S., & Giovannelli, D. (2019). Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in Microbiology*, 10, 780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
- Mitsuzawa, S., Kagawa, H., Li, Y., Chan, S., Paavola, C., & Trent, J. (2009). The rosettazyme: a synthetic cellulosome. *Journal of Biotechnology*, 143(2), 139-144. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.06.019>
- Munson-Mcgee, J., Peng, S., Dewerff, S., Stepanauskas, R., Whitaker, R., Weitz, J., & Young, M. (2018). A virus or more in (nearly) every cell: ubiquitous networks of virus-host interactions in extreme environments. *ISME Journal*, 12(7), 1706-1714. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0071-7>

- Munson-Mcgee, J., Snyder, J., & Young, M. (2018). Archaeal viruses from high-temperature environments. *Genes*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/genes9030128>
- Nelson-Sathi, S., Sousa, F., Roettger, M., Lozada-Chávez, N., Thiergart, T., Janssen, A., Bryant, D., Landan, G., Schönheit, P., Siebers, B., McInerney, J., & Martin, W. (2015). Origins of major archaeal clades correspond to gene acquisitions from bacteria. *Nature*, 517(7532), 77-80. <https://doi.org/10.1038/nature13805>
- Nitsch, M., Klumpp, M., Lupas, A., & Baumeister, W. (1997). The thermosome: alternating α and β -subunits within the chaperonin of the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Molecular Biology*, 267(1), 142-149. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0849>
- Olichon, A., Schweizer, D., Muyldermans, S., & de Marco, A. (2007). Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnology*, 7(7). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-7>
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 334-348. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.334-348.1999>
- Ortmann, A., Wiedenheft, B., Douglas, T., & Young, M. (2006). Hot crenarchaeal viruses reveal deep evolutionary connections. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 520-528. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1444>
- Palm, P., Schleper, C., Grampp, B., Yeats, S., McWilliam, P., Reiter, W., & Zillig, W. (1991). Complete nucleotide sequence of the virus SSV1 of the archaeobacterium *Sulfolobus shibatae*. *Virology*, 185(1), 242-250. doi:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90771-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90771-3)
- Parsell, D. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics*, 27(1), 437-496. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.27.1.437>
- Patchett, M., Neal, T., Schofield, L., Strange, R., Daniel, R., & Morgan, H. (1989). Heat treatment purification of thermostable cellulase and hemicellulase enzymes expressed in *E. coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(2), 113-115. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90069-0)

- Payne, S. (2017). Virus interactions with the cell. *Viruses*, 23-35. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803109-4.00003-9>
- Pina, M., Bize, A., Forterre, P., & Prangishvili, D. (2011). The archeoviruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(6), 1035-1054. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00280.x>
- Prangishvili, D. (2013). The wonderful world of archaeal viruses. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 565-585. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155633>
- Prangishvili, D., Bamford, D., Forterre, P., Iranzo, J., Koonin, E., & Krupovic, M. (2017). The enigmatic archaeal virosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 724-739. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.125>
- Prangishvili, D., Stedman, K., & Zillig, W. (2001). Viruses of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Trends in Microbiology*, 9(1), 39-43. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01910-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01910-7)
- Quaite-Randall, E., Trent, J., Josephs, R., & Joachimiak, A. (1995). Conformational cycle of the archaeosome, a TCP1-like chaperonin from *Sulfolobus shibatae*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28818-28823. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28818>
- Quehenberger, J., Shen, L., Albers, S., Siebers, B., & Spadiut, O. (2017). *Sulfolobus* - A potential key organism in future biotechnology. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2474. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02474>
- Quemin, E., Chlanda, P., Sachse, M., Forterre, P., Prangishvili, D., & Krupovic, M. (2016). Eukaryotic-like virus budding in archaea. *MBio*, 7(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01439-16>
- Quemin, E., & Quax, T. (2015). Archaeal viruses at the cell envelope: entry and egress. *Frontiers in Microbiology*, 6, 552. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00552>
- Ranawat, P., & Rawat, S. (2017a). Radiation resistance in thermophiles: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 1-22. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2279-5>

- Ranawat, P., & Rawat, S. (2017b). Stress response physiology of thermophiles. *Archives of Microbiology*, *199*(3), 391-414. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1331-4>
- Reitz, T., Merroun, M. L., Rossberg, A., & Selenska-Pobell, S. (2010). Interactions of *Sulfolobus acidocaldarius* with uranium. *Radiochimica Acta*, *98*(5), 249-257. <https://doi.org/10.1524/ract.2010.1716>
- Rensen, E., Mochizuki, T., Quemin, E., Schouten, S., Krupovic, M., & Prangishvili, D. (2016). A virus of hyperthermophilic archaea with a unique architecture among DNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(9), 2478-2483. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518929113>
- Rice, G., Stedman, K., Snyder, J., Wiedenheft, B., Willits, D., Brumfield, S., McDermott, T., & Young, M. (2001). Viruses from extreme thermal environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(23), 13341-13345. <https://doi.org/10.1073/pnas.231170198>
- Robb, F., & Clark, D. (1999). Adaptation of proteins from hyperthermophiles to high pressure and high temperature. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *1*(1), 101-105. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10941791/>
- Rothschild, L., & Mancinelli, R. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, *409*, 1092-1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>
- Roy, M., Gupta, S., Patranabis, S., & Ghosh, A. (2018). The oligomeric plasticity of Hsp20 of *Sulfolobus acidocaldarius* protects environment-induced protein aggregation and membrane destabilization. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1860*(12), 2549-2565. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.09.005>
- Ruggero, D., Ciammaruconi, A., & Londei, P. (1998). The chaperonin of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is an RNA-binding protein that participates in ribosomal RNA processing. *EMBO Journal*, *17*(12), 3471-3477. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3471>
- Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(10), 630-642. <https://doi.org/10.1038/nrm3658>

- Sakai, H., & Kurosawa, N. (2018). *Saccharolobus caldissimus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic iron-reducing hyperthermophilic archaeon isolated from an acidic terrestrial hot spring, and reclassification of *sulfolobus solfataricus* as *saccharolobus solfataricus* comb. nov. and. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(4), 1271-1278. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002665>
- Santoro, M. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 55-63. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00299-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00299-3)
- Schleper, C., Kubo, K., & Zillig, W. (1992). The particle SSV1 from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* is a virus: demonstration of infectivity and of transfection with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7645-7649. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7645>
- Schlesinger, M. (1990). Heat Shock Proteins. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 265(21), 402-405. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00685-9>
- Schlesinger, M. J. (1994). How the cell copes with stress and the function of heat shock proteins. *Pediatric Research*, 36(1), 1-6. <https://doi.org/10.1203/00006450-199407001-00001>
- Schmidt, K., Beck, K., & Grogan, D. (1999). UV stimulation of chromosomal marker exchange in *Sulfolobus acidocaldarius*: implications for DNA repair, conjugation and homologous recombination at extremely high temperatures. *Genetics*, 152(4), 1407-1415. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.4.1407>
- Schoehn, G., Quait-Randall, E., Jiménez, J., Joachimiak, A., & Saibil, H. (2000). Three conformations of an archaeal chaperonin, TF55 from *Sulfolobus shibatae*. *Journal of Molecular Biology*, 296(3), 813-819. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3505>
- She, Q., Singh, R., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M., Chan-Weiher, C., Clausen, I., Curtis, B., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A., Kozera, C., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H., & van der Oost, J. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 7835-7840. <https://doi.org/10.1073/pnas.141222098>

- Simon, G., Walther, J., Zabeti, N., Combet-Blanc, Y., Auria, R., van der Oost, J., & Casalot, L. (2009). Effect of O₂ concentrations on *Sulfolobus solfataricus* P2. *FEMS Microbiology Letters*, 299(2), 255-260. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01759.x>
- Skjærven, L., Cuellar, J., Martínez, A., & Valpuesta, J. (2015). Dynamics, flexibility, and allostery in molecular chaperonins. *FEBS Letters*, 589(19), 2522-2532. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.019>
- Snyder, J., Stedman, K., Rice, G., Wiedenheft, B., Spuhler, J., & Young, M. (2003). Viruses of hyperthermophilic Archaea. *Research in Microbiology*, 154(7), 474-482. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00127-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00127-X)
- Sørensen, J., Kristensen, T., & Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6(11), 1025-1037. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x>
- Spang, A., Caceres, E., & Ettema, T. (2017). Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science*, 357(6351). <https://doi.org/10.1126/science.aaf3883>
- Stedman, K., Schleper, C., Rumpf, E., & Zillig, W. (1999). Genetic requirements for the function of the archaeal virus SSV1 in *Sulfolobus solfataricus*: construction and testing of viral shuttle vectors. *Genetics*, 152(4), 1397-1405. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.4.1397>
- Stedman, K., She, Q., Phan, H., Arnold, H., Holz, I., Garrett, R., & Zillig, W. (2003). Relationships between fuselloviruses infecting the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*: SSV1 and SSV2. *Research in Microbiology*, 154(4), 295-302. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00074-3](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00074-3)
- Sterner, R., & Liebl, W. (2001). Thermophilic adaptation of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1), 39-106. <https://doi.org/10.1080/20014091074174>
- Stetter, K. (2006). History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles*, 10(5), 357-362. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0012-7>

- Taguchi, H., Yamaguchi, H., Yamamoto, T., & Kamiya, S. (1996). Immunocytochemical localization of 60-kDa heat shock protein in *Vibrio cholerae*. *Zentralblatt Fur Bakteriologie*, 284(4), 496-500. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(96\)80002-8](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(96)80002-8)
- Tissi eres, A., Mitchell, H., & Tracy, U. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, 84(3), 389-398. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90447-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90447-1)
- Trent, J., Gabrielsen, M., Jensen, B., Neuhard, J., & Olsen, J. (1994). Acquired thermotolerance and heat shock proteins in thermophiles from the three phylogenetic domains. *Journal of Bacteriology*, 176(19), 6148-6152. <https://doi.org/10.1128/jb.176.19.6148-6152.1994>
- Trent, J., Kagawa, H., Yaoi, T., Olle, E., & Zaluzec, N. (2002). Chaperonin filaments: the archaeal cytoskeleton? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 5383-5388. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5383>
- Trent, J. (2000). Extremophiles in astrobiology: per Ardua ad Astra. *Gravitational and Space Biology Bulletin: Publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*, 13(2), 5-11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11543281>
- Trent, J., Osipiuk, J., & Pinkau, T. (1990). Acquired thermotolerance and heat shock in the extremely thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus* sp. strain B12. *Journal of Bacteriology*, 172(3), 1478-1484. <https://doi.org/10.1128/jb.172.3.1478-1484.1990>
- Trent, D. (1996). A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3), 249-258. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(96\)00016-2](https://doi.org/10.1016/0168-6445(96)00016-2)
- Trent, D., Kagawa, H., Paavola, C., McMillan, R., Howard, J., Jahnke, L., Lavin, C., Embaye, T., & Henze, C. (2003). Intracellular localization of a group II chaperonin indicates a membrane-related function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15589-15594. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136795100>

- Trent, D., Kagawa, H., & Yaoi, T. (1998). The role of chaperonins in vivo: the next frontier. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, 36-47. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08974.x>
- Trent, D., Nimmesgern, E., Wall, J., Hartl, F., & Horwich, A. (1991). A molecular chaperone from a thermophilic archaebacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1. *Nature*, 354(6353), 490-493. <https://doi.org/10.1038/354490a0>
- Uldahl, K., Jensen, S., Bhoobalan-Chitty, Y., Martínez-Álvarez, L., Papatthanasious, P., & Peng, X. (2016). Life cycle characterization of Sulfolobus monocaudavirus 1, an Extremophilic Spindle-Shaped Virus with Extracellular Tail Development. *Journal of Virology*, 90(12), 5693-5699. <https://doi.org/10.1128/jvi.00075-16>
- Vallin, J., & Grantham, J. (2019). The role of the molecular chaperone CCT in protein folding and mediation of cytoskeleton-associated processes: implications for cancer cell biology. *Cell Stress and Chaperones*, 24(1), 17-27. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0949-3>
- Van de Vossenberg, J., Driessen, A., & Konings, W. (1998). The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles*, 2(3), 163-170. <https://doi.org/10.1007/s007920050056>
- VanBogelen, R., & Neidhardt, F. (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15), 5589-5593. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5589>
- Verhees, C., Kengen, S., Tuininga, J., Schut, G., Adams, M., De Vos, W., & van der Oost, J. (2003). The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochemical Journal*, 375(Pt. 2), 231-246. <https://doi.org/10.1042/BJ20021472>
- Vierke, G., Engelmann, A., Hebbeln, C., & Thomm, M. (2003). A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 18-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209250200>
- Villela, S., Kraiem, H., Bouhaouala-Zahar, B., Bideaux, C., Aceves, C., & Fillaudeau, L. (2020). A protocol for recombinant protein quantification by densitometry. *MicrobiologyOpen*, 9(6), 1175-1182. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1027>

- Visweswaran, G., Dijkstra, B., & Kok, J. (2011). Murein and pseudomurein cell wall binding domains of bacteria and archaea—a comparative view. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5), 921-928. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3637-0>
- Vorob'eva, L. (2003). Stressors, stress reactions and survival of bacteria: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(3), 217-224. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283326>
- Waldmann, T., Nimmesgern, E., Nitsch, M., Peters, J., Pfeifer, G., Müller, S., Kellermann, J., Engel, A., Hartl, F., & Baumeister, W. (1995). The thermosome of *Thermoplasma acidophilum* and its relationship to the eukaryotic chaperonin TRiC. *European Journal of Biochemistry*, 227(3), 848-856. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20210.x>
- Walter, S., & Buchner, J. (2002). Molecular chaperones — Cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie - International Edition*, 41(7), 1098-1113. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020402\)41:7<1098::AID-ANIE1098>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020402)41:7<1098::AID-ANIE1098>3.0.CO;2-9)
- Wang, F., Cvirkaite-Krupovic, V., Kreutzberger, M., Su, Z., de Oliveira, G., Osinski, T., Sherman, N., DiMaio, F., Wall, J., Prangishvili, D., Krupovic, M., & Egelman, E. (2019). An extensively glycosylated archaeal pilus survives extreme conditions. *Nature Microbiology*, 4(8), 1401-1410. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0458-x>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., & Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wiedenheft, B., Stedman, K., Roberto, F., Willits, D., Gleske, A., Zoeller, L., Snyder, J., Douglas, T., & Young, M. (2004). Comparative genomic analysis of hyperthermophilic Archaeal Fuselloviridae Viruses. *Journal of Virology*, 78(4), 1954-1961. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.4.1954-1961.2004>

- Wilhelm, S., & Suttle, C. (1999). Viruses and nutrient cycles in the sea: viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *BioScience*, *49*(10), 781-788. <https://doi.org/10.2307/1313569>
- Willison, K., & Horwich, A. (1996). Structure and Function of Chaperonins in Archaeobacteria and Eukaryotic Cytosol. *The Chaperonins*, 107-136. <https://doi.org/10.1016/b978-012237455-5/50006-3>
- Woese, C., Kandler, O., & Wheelis, M. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, *87*(12), 4576-4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>
- Wood, A., Whitman, W., & Koniskyl, J. (1989). Isolation and characterization of an archaeobacterial viruslike particle from *Methanococcus voltae* A3. In *Journal of Bacteriology*, *171*(1). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Yaoi, T., Kagawa, H., & Trent, J. (1998). Chaperonin filaments: their formation and an evaluation of methods for studying them. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *356*(1), 55-62. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0758>
- Yaoi, T., Trent, J., McMillan, R., Brocchieri, L., Alton, T., & Kagawa, H. (2004). The composition, structure and stability of a group II chaperonin are temperature regulated in a hyperthermophilic archaeon. *Molecular Microbiology*, *48*(1), 1092. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03418.x>
- Yamamoto, Y. Y., & Yohda, M. (2016). Thermosome: A Group II Chaperonin of Archaea. *ELS*, *January*, 1–7. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0026332>
- Yeats, S., McWilliam, P., & Zillig, W. (1982). A plasmid in the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *The EMBO Journal*, *1*(9), 1035-1038. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01292.x>

- Yokota, S., Yanagi, H., Yura, T., & Kubota, H. (2000). Upregulation of cytosolic chaperonin CCT subunits during recovery from chemical stress that causes accumulation of unfolded proteins. *European Journal of Biochemistry*, 267(6), 1658-1664. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01157.x>
- Zillig, W., Arnold, H., Holz, I., Prangishvili, D., Schweier, A., Stedman, K., She, Q., Phan, H., Garrett, R., & Kristjansson, J. (1998). Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Extremophiles*, 2(3), 131-140. <https://doi.org/10.1007/s007920050052>
- Zillig, W., Kletzin, A., Schleper, C., Holz, I., Janekovic, D., Hain, J., Lanzendörfer, M., & Kristjansson, J. (1993). Screening for Sulfolobales, their Plasmids and their Viruses in Icelandic Solfataras. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(4), 609-628. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80333-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80333-4)