



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Microbiología Molecular

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA Spo0M
DE *Bacillus subtilis***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Luz Adriana Vega Cabrera

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Lilitiana Pardo López
Instituto de Biotecnología, UNAM

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

Dra. Susana López Charretón
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Christian Sohlenkamp
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Liliana Pardo López.

Se agradece el apoyo financiero otorgado por CONACyT a través de la beca No. 332741 para estudios de posgrado, y el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), a través de los proyectos IN201012-3 e IN204016, para la realización parcial de esta tesis. Así mismo, se agradece al Programa de Apoyo para Estudiantes de Posgrado (PAEP-UNAM) por el apoyo brindado para la asistencia a congresos nacionales e internacionales en donde se presentó este trabajo.

CONTENIDO

Agradecimientos.....	4
Dedicatoria.....	6
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	8
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	10
Abstract.....	11
Introducción y antecedentes.....	12
<i>Bacillus subtilis</i> y el proceso de esporulación.....	12
La división celular en <i>Bacillus subtilis</i>	15
Regulador de la esporulación Spo0M.....	18
Hipótesis y objetivos.....	21
Hipótesis.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	21
Metodología.....	22
Métodos generales.....	22
Cinéticas de crecimiento.....	23
Pruebas de esporulación.....	24
Generación de los plásmidos pUCm y pΔ0M.....	24
Generación del plásmido pT7-Spo0M-FLAG.....	25
Transformación de las cepas de <i>B. subtilis</i>	25
Microscopía.....	26
Microscopía de súper resolución.....	26
SDS-PAGE y Western Blot.....	27
Interactoma.....	28
Citometría de flujo de imagen.....	28
Experimentos de co-inmunoprecipitación.....	29
Resultados y discusión.....	30
Generación y análisis fisiológico y fenotípico de una mutante nula en <i>spo0M</i>	30
Localización subcelular y análisis de la expresión de Spo0M.....	39
Determinación de los elementos de interacción de Spo0M EN <i>B. subtilis</i>	46

Identificación de homólogos de Spo0M en diferentes géneros bacterianos y de arqueas	56
Conclusiones y perspectivas	59
Conclusiones.....	59
Perspectivas.....	59
Referencias.....	61

Agradecimientos

A la Dra. Liliana Pardo, por la confianza que depositó en mí y por ser una guía maravillosa. Gracias por permitirme desarrollar mis ideas, darme todo el apoyo y las herramientas que necesité, pero sobre todo, gracias por tu paciencia y por tu amistad. Eres un excelente ser humano y mi modelo a seguir como una investigadora comprometida, ética y capaz.

Al Ing. Enrique Merino, por recibirme con los brazos abiertos en su grupo. Muchísimas gracias por los consejos teóricos y prácticos que fueron siempre brillantes. Gracias enormes por tu sonrisa, tu buen humor y tu incondicional apoyo.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Christian Sohlenkamp y la Dra. Susana López, por todas sus aportaciones, comentarios, correcciones y análisis de mi proyecto. Gracias por tener siempre una palabra amable para motivarme y alentarme a continuar con el trabajo, aún en los momentos complicados.

A la M. en C. María Luisa Tabche, por todo el apoyo técnico para la realización de este proyecto. Gracias por tener la disponibilidad de ayudarme siempre, por todos los pequeños y grandes detalles que permiten que el laboratorio marche en perfecta armonía y con gran administración. Muchísimas gracias por tu amistad.

A la Dra. Rosa María Gutiérrez, muchas gracias por todos los aportes y consejos que permitieron el avance de mi proyecto.

A todo el laboratorio Merino-Espín, muchísimas gracias por conformar un excelente equipo de trabajo y por brindarme un espacio ideal, con excelente ambiente y siempre dispuesto a colaborar. Gracias por todas las pláticas, las risas, los bailes y todo lo demás que llenaron este tiempo de formación. Fue un placer y una gran enseñanza trabajar con cada uno de ustedes.

A Rosalva González, gracias por todo el increíble trabajo administrativo que desarrollas y que nos permite a todos tener materiales para realizar nuestras labores.

Al Dr. Lorenzo Segovia, por su interés en el avance de mi proyecto, por siempre darme ánimos, por su amabilidad y su eterna sonrisa.

A los miembros del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, principalmente a los Dres. Chris Wood, Adán Guerrero, Arturo Pimentel, Juan García y el M. en C. Andrés Saralegui, gracias por su paciencia y la ayuda técnica. Gracias por hacer del tiempo en el microscopio horas agradables.

Al departamento de docencia del IBt, al Ing. Jalil Saab Hassanile, Gloria Villa y al Lic. Antonio Bolaños Guillén. Gracias por un trabajo excelente, por estar siempre dispuestos a ayudar y facilitar todos los trámites.

A los miembros de mi jurado, gracias por su tiempo, sus aportes y sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis.

Dedicatoria

A mi familia.

Dedico esta tesis a mis padres, como muestra de agradecimiento por su apoyo incondicional, su paciencia y sus consejos. Gracias por creer en mí.

Mi tesis y todo mi posgrado siempre ha sido dedicado a mi hermano, Abraham. Gracias por ser mi motor y mi más grande motivación. Mi trabajo es por y para ti.

Índice de figuras

Figura 1. Cascada de regulación durante la esporulación en <i>B. subtilis</i>	14
Figura 2. Elementos que componen el divisoma en <i>B. subtilis</i>	16
Figura 3. Diferencias entre la división celular medial y polar.	17
Figura 4. Esquema de las estructuras tridimensionales de proteínas pertenecientes a la familia de las arrestinas.	20
Figura 5. Interrupción del gen de <i>spo0M</i> con un casete de resistencia a antibiótico, para la generación de una cepa mutante $\Delta 0M$	31
Figura 6. Comparación de las cinéticas de crecimiento de las cepas silvestre y mutante en <i>spo0M</i>	31
Figura 7. Análisis de la esporulación en las cepas silvestre y mutante en <i>spo0M</i>	32
Figura 8. La cepa mutante en <i>spo0M</i> presenta un fenotipo filamentoso durante el crecimiento vegetativo.	33
Figura 9. Diferencias morfológicas entre las cepas silvestre y mutante en <i>spo0M</i>	34
Figura 10. Generación de la cepa mutante GFP:ZapA: $\Delta 0M$	35
Figura 11. Diferencias en el posicionamiento de los septos entre las cepas silvestre y mutante en <i>spo0M</i>	38
Figura 12. Generación de las cepas con la fusión fluorescente Spo0M:DsRed	39
Figura 13. La fusión fluorescente Spo0M:DsRed complementa el fenotipo de las cepas mutantes $\Delta 0M$	41
Figura 14. Localización subcelular de Spo0M:DsRed.....	42
Figura 15. Diagrama que muestra la distribución de Spo0M durante los estadios de desarrollo de <i>B. subtilis</i>	43
Figura 16. Análisis de la expresión de Spo0M:DsRed mediante Western Blot.....	44
Figura 17. Identificación de un posible sitio de unión del factor sigmaA a la región promotora de <i>spo0M</i>	46
Figura 18. Generación de la fusión Spo0M-FLAG.	47
Figura 19. Identificación de los elementos de interacción de Spo0M en <i>B. subtilis</i>	48
Figura 20. Gráfico que resume los resultados del análisis de los elementos de interacción de Spo0M en <i>B. subtilis</i>	48
Figura 21. Spo0M interactúa con proteínas involucradas en la división celular.....	56
Figura 22. Homólogos de Spo0M se encuentran presentes en géneros bacterianos y de arqueas esporulantes y no esporulantes.....	57

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados	22
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados.	23
Tabla 3. Posibles elementos de interacción de Spo0M.....	48

Abreviaturas

$\sigma^{A,B,E,F,G,H,K,W}$	Factores sigma de <i>Bacillus subtilis</i> , activados en diferentes etapas de vida de la bacteria
~P	Proteína fosforilada
ATP	Adenosin trifosfato
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de búsqueda de alineamientos locales)
COIP	Co-inmunoprecipitación
col.	Colaboradores
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMCCD	Electron Multiplying Charge-Coupled Device (Dispositivo de multiplicación de electrons de carga acoplada)
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (Microscopía de fluorescencia de imagen en tiempo real)
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer (Transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	kilo Daltones
LB	Medio Luria Bertani
MAP	Mitogen Activated Protein (Proteínas activadas por mitógenos)
NOC	Nucleoid Occlusion System (Sistema de oclusión del nucleoide)
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600nm
pb	Pares de bases
PBPs	Penicillin Binding Proteins (Proteínas de unión a la penicilina)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	para-formaldehído
pH	Potencial de Hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
SASPs	Small Acid-Soluble Proteins (Proteínas pequeñas ácidas solubles)
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence (Reflexión total interna de la fluorescencia)
tRNA	RNA de transferencia
WB	Western Blot

Resumen

Bacillus subtilis es una bacteria aerobia, Gram positiva, que se utiliza ampliamente como modelo de estudio en procesos de diferenciación, y en la industria, en la producción heteróloga de proteínas. La esporulación en *B. subtilis* se considera en sí misma un proceso de diferenciación celular que permite a la bacteria sobrevivir condiciones adversas. Existen un gran número de reguladores positivos y negativos involucrados en este proceso, la mayoría ya han sido ampliamente estudiados. A pesar de ello, Spo0M es un regulador de la esporulación cuyo mecanismo de acción no ha sido aún caracterizado.

Spo0M no es indispensable para la viabilidad, sin embargo, cuando se encuentra en bajas concentraciones, la esporulación disminuye y se bloquea en la etapa cero; durante el crecimiento vegetativo las células son filamentosas y susceptibles a lisis. De igual manera, la sobre expresión de la proteína produce una disminución en la esporulación, lo que sugiere que su concentración debe estar estrictamente regulada. Spo0M está bajo la regulación de dos diferentes factores sigma: el primero, el factor sigma vegetativo y de fase estacionaria, σ^H , y el segundo, el factor sigma de respuesta a estrés σ^W . La concentración de Spo0M se mantiene en niveles adecuados para su funcionamiento gracias a la actividad de la metaloproteasa FtsH. Se desconoce si existen otros mecanismos de regulación sobre Spo0M, y su función durante la fase de vida vegetativa de la bacteria no se ha estudiado hasta ahora.

En este trabajo, hemos encontrado datos que valoran la hipótesis de que Spo0M está involucrado en procesos de división celular durante la etapa de crecimiento vegetativo de la bacteria; hemos observado que en una mutante nula de *spo0M* las células son filamentosas, tienen anomalías en la membrana plasmática y diferencias en el posicionamiento del septo con respecto a las células silvestres. El objetivo de este trabajo es la caracterización de la función de Spo0M en los procesos de división celular y esporulación de la bacteria y la localización de la proteína en las células. La caracterización total de la función de Spo0M nos permite ahondar en el entendimiento del proceso de esporulación y asignar una función hasta ahora desconocida para esta proteína.

Abstract

Bacillus subtilis is an aerobic, Gram positive bacterium, which has been widely used as a model for studying processes like sporulation and heterologous production of proteins. Sporulation in *B. subtilis* may be considered as a mechanism of cell differentiation which allows cells to withstand adverse conditions. There are a number of positive and negative regulators of sporulation. Spo0M is a protein which controls sporulation, yet the mechanism by which it performs this function has not been specified.

Spo0M is dispensable for viability, however, when its intracellular concentration is low, sporulation is diminished and blocked at stage zero; cells growing in vegetative stage are filamentous and susceptible to lysis. In a similar fashion, overexpression of Spo0M similarly causes a blockage of sporulation, which suggests that its concentration should be strictly regulated. Spo0M is under the control of two different sigma factors: first, the vegetative and stationary phase sigma factor, σ^H , and second, the stress responsive sigma factor σ^W . Spo0M concentration is maintained at optimal levels by the proteolytic activity of the metalloprotease FtsH. It is not known if there is another regulatory mechanisms acting on Spo0M and its function during the vegetative stage of life of the bacterium has not yet been studied.

In this work, we found evidence supporting the hypothesis that Spo0M is involved in the cell division process of the bacterium during the vegetative stage of growth; we observed that a *spo0M* null mutant generates filamentous cells with abnormalities in the cell membrane and differences in septum location, compared to the wild type cells. The aim of this work is to characterize the function of Spo0M in the cell division process and sporulation of the bacterium, as well as the location of the protein within the cell. Full characterization of the Spo0M function allows us to go deeper our understanding of the sporulation process and to assign a novel function, until now undefined, to this protein.

Introducción y antecedentes

Bacillus subtilis Y EL PROCESO DE ESPORULACIÓN

Bacillus subtilis es una bacteria aerobia, Gram positiva, que se utiliza ampliamente como modelo de estudio para procesos como el de la esporulación. La esporulación en *B. subtilis* puede considerarse como un mecanismo de diferenciación celular que permite a la célula resistir condiciones de depleción de nutrientes o la exposición a diferentes tipos de estrés, como altas temperaturas o variaciones de pH.

La esporulación en *B. subtilis* está regulada por una cascada de fosforilación que se inicia cuando se fosforila Spo0A (Spo0A~P), el máximo regulador transcripcional de este proceso (1). Las histidinas cinasas sensoriales KinA, B, C, D y E detectan señales intra y extracelulares que llevan a desencadenar la cascada de fosforilación para activar a Spo0A (1). Estas cinasas reciben el nombre de histidinas cinasas huérfanas (Orphan HKs) (Fig.1) debido a que carecen de un regulador de respuesta que esté adyacente a ellas, como ocurre normalmente en los eucariotas. Sin embargo, no todas las cinasas participan en el proceso de esporulación, hay evidencias que sugieren que sólo KinA y KinB son capaces de transferir el fosfato al siguiente componente en la cadena, la fosfotransferasa Spo0E (2), y ésta a su vez a la proteína Spo0B, quien finalmente transfiere el fosfato a Spo0A para su activación. Por su parte KinC es capaz de fosforilar directamente a Spo0B y permitir la fosforilación de Spo0A (1).

Una vez activado, es necesario que la concentración de Spo0A~P sobrepase un nivel de barrera que permita que ocurra la esporulación. En *B. subtilis*, antes de la esporulación, las células activan procesos de resistencia como la competencia o el canibalismo, que también dependen de la activación de Spo0A para desencadenarse (1). La decisión de la célula depende entonces de la concentración de Spo0A~P, y esta etapa de toma de decisiones se conoce como la etapa cero de la esporulación. Durante la etapa I ocurre la duplicación del cromosoma bacteriano, que se acomoda como un filamento axial unido a ambos polos celulares. Durante estas dos etapas, la célula aún puede revertir la decisión de esporular y regresar al crecimiento vegetativo si las condiciones del medio son favorables. A partir de la etapa II se adquiere el compromiso de la esporulación; en esta etapa ocurre la división asimétrica y constituye un paso irreversible del proceso. En la etapa III ocurre el engullimiento. La etapa IV abarca la formación

del córtex, una estructura protectora formada de proteoglicanos. El abrigo es segunda estructura protectora de la espora, y se forma durante la etapa V. Durante la etapa VI ocurre la maduración de la espora, y finalmente, durante la etapa VII la célula madre se lisa y se libera la espora madura (3).

Desde el inicio de la división asimétrica, distintos programas genéticos se encienden en las dos células, debido en parte a que existen factores sigma específicos de la célula madre o de la pre-espora que dirigen el proceso (Fig. 1). El primero de estos factores es σ^H , codificado por *spo0H*, que regula la transcripción de *spo0A* (4) y a los genes asociados con la transición entre la etapa de crecimiento exponencial y la fase estacionaria (5). Después de su transcripción, Spo0A puede activarse, como se mencionó anteriormente, y Spo0A~P controla la expresión de más de 100 genes involucrados en el proceso de esporulación (6).

σ^F es el primer factor sigma específico de la pre-espora y se mantiene inactivo por su unión con el factor anti-sigma SpoIIAB. La expresión de σ^F ocurre a partir del operón *spoIIAA-spoIIAB-sigF* y está regulada por σ^H y Spo0A~P (7). SpoIIAB es capaz de fosforilar a SpoIIAA, el factor anti-anti-sigma. Cuando SpoIIAA está fosforilado está inactivo. σ^H y Spo0A~P también estimulan la expresión de la fosfatasa SpoIIIE en la pre-espora, y ésta es capaz de defosforilar a SpoIIAA para activarlo. Una vez activo SpoIIAA se puede unir a SpoIIAB y liberar al factor σ^F , que puede entonces dirigir la expresión de genes de la pre-espora (8) y la activación del factor σ^E , el primero específico de la célula madre. La activación de σ^F en la pre-espora induce la expresión de *spoIIR*, un factor requerido para la activación de la proteasa SpoIIGA, capaz de procesar al factor sigma inactivo pre- σ^E , liberando el factor σ^E , que estimula la transcripción de genes específicos de la célula madre (1) (Fig. 1).

En la siguiente etapa, un producto de σ^E , SpoIIIA, junto con SpoIIJ, presente en la pre-espora, estimulan la liberación de σ^G , el segundo factor sigma específico de la pre-espora, que está protegido por un factor anti-sigma desconocido (9). σ^G puede dirigir entonces la transcripción específica de genes de la espora, como los que codifican para las llamadas proteínas solubles-ácidas pequeñas (SASPs, del Inglés, *Small Acid-Soluble Proteins*), encargadas de empaquetar y proteger al DNA en esta estructura (3). Otro de los productos de los genes regulados por σ^G es SpoIVB que proteoliza a SpoIVFA, del multicomplejo SpoIVFA-SpoIVFB-BofA presente en la célula madre (10). La proteólisis permite la

separación de BofA, una proteína inhibitoria, de la proteasa SpoIVFB que puede activar a pro- σ^K y liberar al factor σ^K , el segundo específico de la célula madre. σ^K libre estimula la transcripción de genes que llevarán a la lisis de la célula madre y la liberación de la espora (1) (Fig. 1). La espora puede resistir condiciones adversas en el medio y es capaz de germinar cuando encuentra nutrientes y un medio favorable.

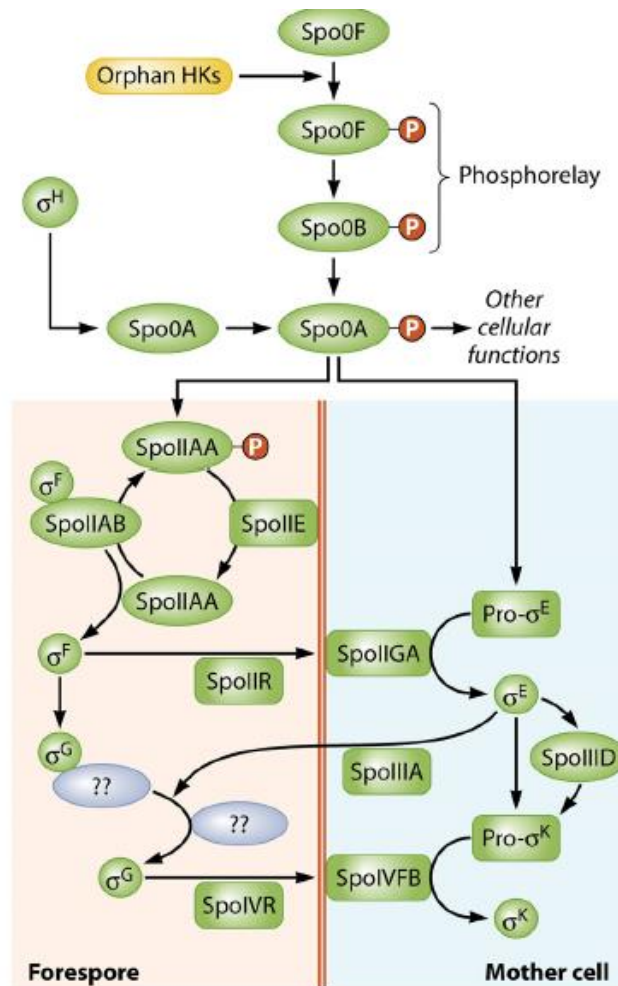


Figura 1. CASCADA DE REGULACIÓN DURANTE LA ESPORULACIÓN EN *B. subtilis*. Las histidinas cinasas (HKs) KinA-E se activan en respuesta a señales desfavorables intra o extracelulares, desencadenando la cascada de fosforilación que lleva a la activación de Spo0A. Estos dos factores estimulan la transcripción de factores sigma específicos en la pre-espora y en la célula madre que regulan genes específicos de estos compartimentos para la liberación de la espora madura. Tomado de (3).

LA DIVISIÓN CELULAR EN *Bacillus subtilis*

Durante su etapa de vida vegetativa, *Bacillus subtilis* se divide por fisión binaria para generar dos células hijas de igual tamaño y con el mismo contenido de material genético. El proceso de división celular en *B. subtilis* es un proceso complejo, que involucra la participación de un gran número de reguladores positivos y negativos que facilitan el ensamble del anillo Z, una estructura constituida por una proteína homóloga a la tubulina eucariota llamada FtsZ. La constricción del anillo Z lleva finalmente a la separación de las dos células hijas. El ensamble del anillo de FtsZ es el paso inicial de la división celular, y todo el complejo proteico que se ensambla a su alrededor para permitir la citocinesis recibe el nombre de divisoma (11–14) (Fig. 2).

El ensamble del anillo Z se regula temporal y espacialmente, de modo que la división celular ocurra sólo cuando la replicación y la segregación del cromosoma bacteriano se han completado. Existen dos sistemas encargados de esta regulación, el sistema Min, formado por las proteínas MinC, D y J, que permiten que FtsZ se ensamble en la región media de la célula y no en los polos, asegurando que se produzcan dos células hijas de igual tamaño (15, 16); y el segundo, el sistema NOC (del Inglés, *Nucleoid Occlusion*), que evita la formación del anillo Z en sitios donde el cromosoma está presente (17).

Una vez que el anillo Z se posiciona correctamente, requiere estabilizarse y anclarse a la membrana, ya que FtsZ por sí misma no se une directamente a la membrana plasmática (Fig. 2). En una primera etapa ocurre el posicionamiento de los dos principales elementos de regulación positiva del ensamble, polimerización y anclaje a la membrana de FtsZ, FtsA y ZapA. FtsA es una proteína perteneciente a la familia de la actina bacteriana y junto con ZapA (del Inglés, *Z ring Associated Protein A*) estimula la polimerización del anillo Z y lo une a la membrana (18–20). En *B. subtilis*, adicionalmente se encuentra la proteína SepF, que actúa como un elemento de unión de FtsZ a la membrana plasmática, pero no es indispensable, pues se cree tiene una función redundante con FtsA (21). Además de los reguladores positivos, se encuentra el principal regulador negativo de la polimerización de FtsZ, EzrA. FtsL participa junto con EzrA para mantener la dinámica del anillo Z (22), de modo que estas proteínas se encargan de mantener una poza disponible de monómeros de FtsZ al estimular su recambio del anillo Z, y adicionalmente asegura la unión de esta estructura a la membrana (22, 23).

FtsA y EzrA estimulan el reclutamiento de proteínas de etapas más avanzadas al divisoma (12, 18), como las proteínas PBPs (del Inglés *Peptidoglycan Binding Proteins*), que dirigen la síntesis de la pared celular para las nuevas células hijas en la región del septo. Entre estas proteínas se encuentran principalmente PBP1 y PBP2b (24, 25), DivIB, DivIC y las hidrolasas FtsEX, que se encargan de lisar la pared celular de la región del septo y coordinarla con la constricción del anillo Z para completar la citocinesis (26). Una vez que esta ha ocurrido, todos los elementos regulatorios se desensamblan y quedan disponibles para un nuevo evento de división celular.

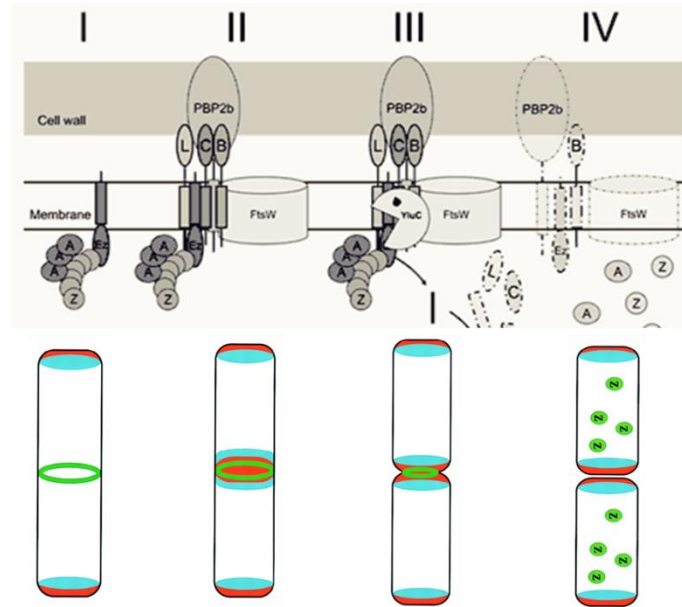


Figura 2. ELEMENTOS QUE COMPONEN EL DIVISOMA EN *B. subtilis*. El proceso de división celular en *B. subtilis* depende de un gran número de elementos regulatorios, que en una primera etapa (I) permiten la polimerización, estabilización y constricción del anillo Z, la estructura que dirige la citocinesis; así mismo, existen elementos que dirigen la síntesis de pared celular en las nuevas células hijas (II) y la hidrólisis de la antigua pared celular de la madre, para asegurar la separación (III). En conjunto, estos elementos reciben el nombre de divisoma. Finalmente, los elementos del divisoma se desensamblan y quedan disponibles para un nuevo evento de división (IV). A. ZapA. Z. FtsZ. EzrA. L. FtsL. B. DivIB. C. DivIC. Modificado de (142).

Como se mencionó anteriormente, cuando *B. subtilis* se enfrenta a condiciones desfavorables inicia el proceso de esporulación. Lo que marca el inicio de la esporulación es la formación de un septo polar constituido básicamente por los mismos elementos que conforman el divisoma durante la división celular medial en la fase vegetativa y el proceso de división en ambos procesos es muy similar (27). Sin embargo, ambos procesos se diferencian por los elementos que determinan la posición del septo, la segregación del cromosoma y la citocinesis (Fig. 3). Durante la división medial, los sistemas NOC y MinCD, permiten el posicionamiento del anillo Z en la región media de la célula, una vez que el

cromosoma replicado se ha distribuido en las dos células hijas; la citocinesis ocurre gracias a la constricción del anillo Z y la síntesis de nueva pared celular (17). Durante la esporulación, el posicionamiento del septo polar lo determina la fosfatasa SpoIIIE, que interactúa con FtsZ y permite la movilización del anillo Z de una posición medial a polar (28). Una vez que el septo se ha establecido, un tercio del cromosoma queda retenido en la pre-espora y el resto lo trasloca la ATPasa SpoIIIA (29). Durante la esporulación la lisis de la célula madre reemplaza a la citocinesis y no existe síntesis de nueva pared celular, ésta en cambio, requiere hidrolizarse para permitir el engullimiento de la pre-espora (30). A pesar de ser procesos ampliamente caracterizados, aún existen ciertos vacíos de información en el estudio de la división celular medial y polar, principalmente debido a la existencia de elementos con funciones redundantes que aún esperan por ser descubiertos.

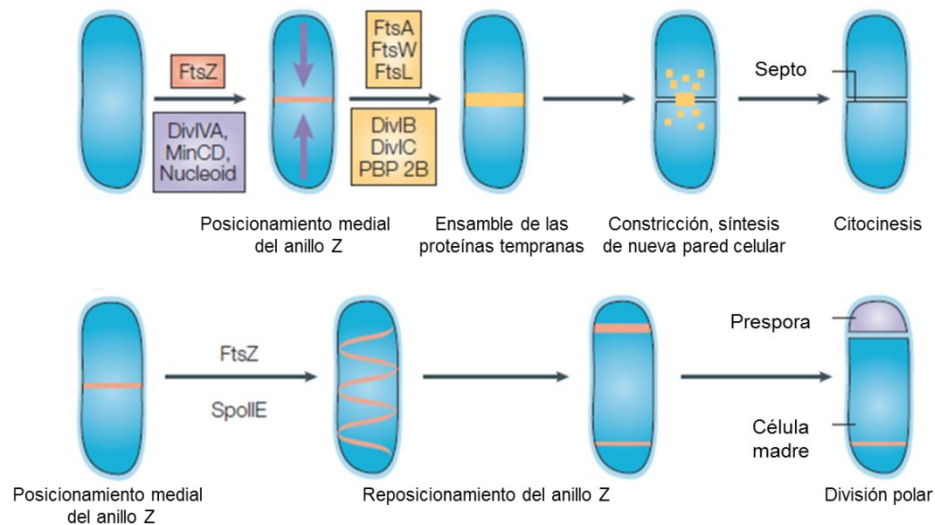


Figura 3. DIFERENCIAS ENTRE LA DIVISIÓN CELULAR MEDIAL Y POLAR. Los elementos que regulan la división celular medial y polar en *B. subtilis* son muy similares, los procesos difieren en los elementos regulatorios que determinan el posicionamiento del septo, la segregación del cromosoma y la citocinesis. modificado de (30).

REGULADOR DE LA ESPORULACIÓN Spo0M

Como se mencionó anteriormente, existe un gran número de reguladores positivos y negativos del proceso de esporulación. Spo0M es una proteína que ha sido previamente reportada como un regulador de la esporulación en *B. subtilis* (31), sin embargo, el mecanismo por el cual lleva a cabo esta función no se ha especificado. El gen *spo0m* se encuentra al final de un clúster grande de genes de tRNAs; el gen codifica para una proteína de 257aa y 29.6kDa, cargada negativamente. Spo0M no es indispensable para la viabilidad, sin embargo, cuando no está presente en las células, la esporulación disminuye considerablemente y las células son susceptibles a lisis durante el crecimiento vegetativo (31). De un modo semejante, la sobre expresión de Spo0M también tiene efectos negativos en la esporulación, lo que sugiere que las concentraciones efectivas de la proteína que permiten que la esporulación ocurra de manera eficiente deben estar dentro de un rango altamente regulado (31). Para mantener estos niveles dentro del rango apropiado, la participación de la metaloproteasa FtsH parece ser indispensable (32). FtsH es una metaloproteasa dependiente de Zn^{+2} y ATP, que procesa a Spo0M *in vitro* (32). Además, FtsH también degrada a las fosfatasas encargadas de defosforilar e inactivar a Spo0A (RapA, RabB, RapE y Spo0E), de modo que en ausencia de FtsH las fosfatasas se mantienen disponibles para inactivar a Spo0A y los niveles de esporulación disminuyen (33).

Poco se sabe de la regulación que existe sobre Spo0M. Inicialmente se reportó que su expresión estaba bajo la regulación del factor sigma de fase vegetativa y fase estacionaria σ^H (5, 31); sin embargo, experimentos más recientes, han demostrado que el factor sigma de estrés σ^W regula adicionalmente a Spo0M (34, 35). Se desconoce la forma en que Spo0M regula el proceso de esporulación. Han y col. reportaron en un estudio inicial de la descripción de este factor que cuando Spo0M no está presente en las células, la expresión de *spo0A* disminuye (31), sin embargo, no se sabe cuál es el mecanismo por el que Spo0M provoca esta disminución en la expresión. A la fecha, se desconoce si Spo0M participa en algún otro proceso dentro de la vida de la bacteria, además de la esporulación.

Se ha propuesto que Spo0M tiene en su secuencia de aminoácidos un dominio de tipo arrestina (36). Las arrestinas constituyen una familia de proteínas ampliamente distribuidas en los organismos eucariotas, que se encargan de funciones tan diversas como la desensibilización de receptores, endocitosis, transducción de señales, regulación de la expresión genética, síntesis de proteínas, reorganización celular, quimiotaxis o apoptosis (37). Los miembros de esta familia cuentan con dos

secuencias homólogas llamadas dominios N y C, separados por un núcleo polar que estabiliza a la proteína en su forma inactiva (38, 39) (Fig. 4A). Cuando la proteína se une a receptores activados y fosforilados este núcleo se desestabiliza y permite la interacción de la arrestina con el receptor, principalmente a través del dominio N. El dominio C facilita la dimerización de la proteína, y esto a su vez puede fortalecer la interacción con el receptor. Ambos dominios se unen a los microtúbulos con gran afinidad (38, 40).

La familia de las arrestinas está formada por 4 proteínas que pueden dividirse en dos categorías: las arrestinas visuales o sensoriales, llamadas también α -arrestinas, arrestina-1 y arrestina-4; y las arrestinas no visuales o β -arrestinas, arrestina-2 y arrestina-3. Estas proteínas están codificadas en genes grandes que contienen de 13 a 17 exones, lo que parece estar conservado tanto en vertebrados como en invertebrados. La similitud estructural entre las arrestinas visuales y las no visuales es sumamente alta, y de igual manera la similitud estructural es alta entre diversos organismos; los residuos que estabilizan a la proteína en su estado inactivo están conservados en todas las arrestinas (40–42).

Las arrestinas son capaces de interactuar con cientos de receptores de la más variada función y estructura. Las modificaciones que las arrestinas pueden sufrir, como ubiquitinaciones o fosforilaciones, determinan el receptor al que se van a unir o la función que llevarán a cabo. Las bases estructurales para que las arrestinas sean capaces de interactuar con esta gran variedad de receptores se desconocen, pero se sugiere que tiene que ver con la flexibilidad del dominio N (38, 43). Se cree que las arrestinas visuales son los miembros más antiguos de la familia de proteínas, debido a que se localizan principalmente en el sistema nervioso y están involucradas en funciones tan básicas como la visión o la olfacción, mientras que las arrestinas no visuales, con funciones más complejas, como la endocitosis, pudieron evolucionar de manera más tardía (41, 42, 44).

Anteriormente se consideraba que las arrestinas habían surgido después de la separación evolutiva de los primeros eucariotas, debido a que no se habían encontrado ancestros de estas proteínas en procariotas o arqueas (36). Sin embargo, se ha reportado que la proteína de control de la esporulación, Spo0M de *Bacillus subtilis*, contiene dominios estructurales similares a los dominios N de la familia de las arrestinas visuales. En un reporte reciente, Sonoda y col., reportaron la estructura cristalográfica de Spo0M (45) (Fig. 4B), y demostraron que efectivamente su estructura es similar al dominio N de las

arrestinas visuales (45) (Fig. 4C). Spo0M está presente en arqueas y bacterias, pero no en los eucariontes; podría especularse que en bacterias la función ancestral de las arrestinas podría asociarse a la remodelación de la membrana o el citoesqueleto, o a la señalización por cinasas (36). Sin embargo, la poca información con la que se cuenta para explicar el mecanismo de acción de Spo0M y su regulación, además de la falta de evidencia experimental que hable de una función distinta a la esporulación, hacen difícil especular acerca de la función como una arrestina verdadera de esta proteína.

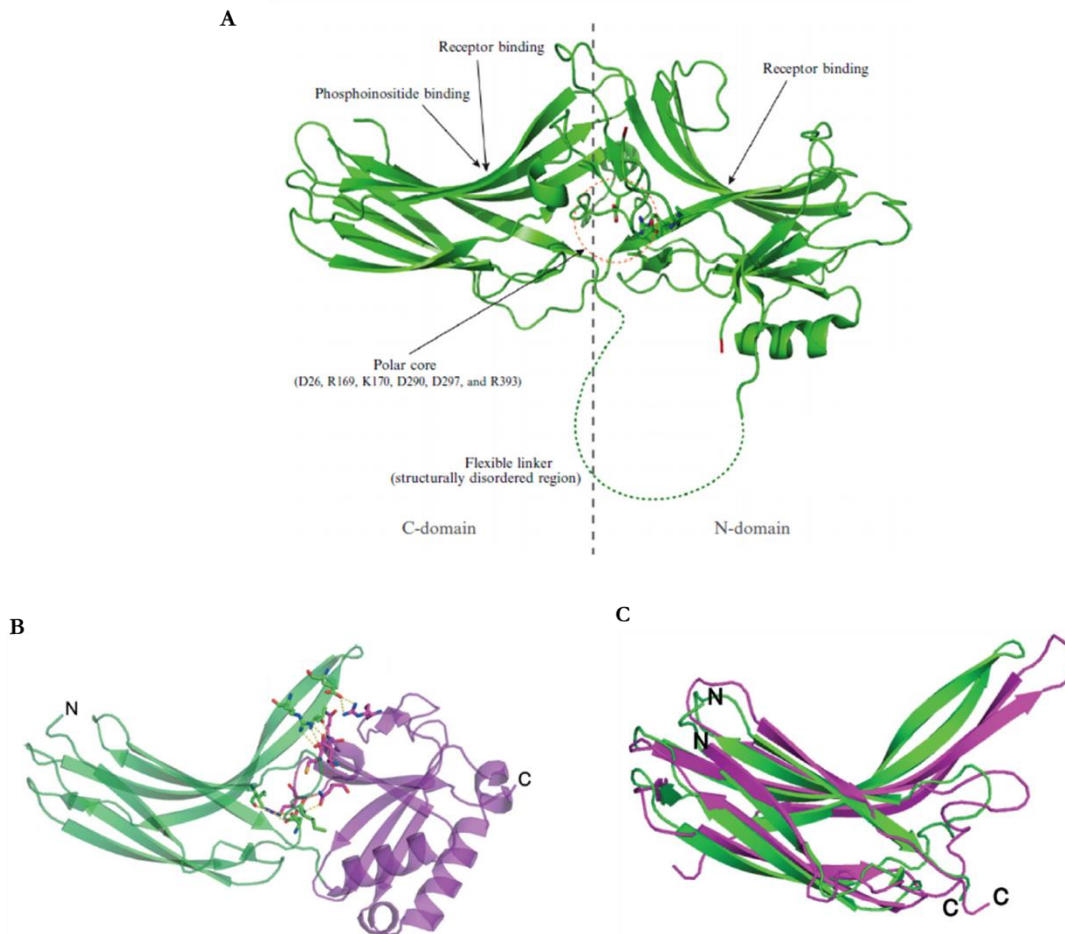


Figura 4. ESQUEMA DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE PROTEÍNAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA DE LAS ARRESTINAS. **A.** Estructura característica de una arrestina, que muestra los dominios N y C, los sitios de unión a receptores y el núcleo polar que estabiliza los dos dominios. Modificado de (39). **B.** Estructura tridimensional de Spo0M, con sus dominios N y C. Modificado de (45) **C.** Superposición de las estructuras tridimensionales del dominio N de las proteínas Spo0M (verde) y TXNIP (proteína de unión de la tiorredoxina), perteneciente a la familia de las arrestinas visuales. Las estructuras tridimensionales son altamente semejantes. Tomado de (45).

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

La proteína Spo0M de *Bacillus subtilis* está involucrada en el proceso de división celular de la bacteria durante las etapas de crecimiento vegetativo y de esporulación

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la función de Spo0M durante las etapas de crecimiento vegetativo y el proceso de esporulación de *B. subtilis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar una mutante nula de Spo0M y analizar su fenotipo
2. Localizar la proteína Spo0M en las células bacterianas
3. Determinar la importancia fisiológica de la interacción de Spo0M con proteínas específicas de *B. subtilis*.

Metodología

MÉTODOS GENERALES.

Las cepas utilizadas son derivados isogénicos de las cepas de *B. subtilis* 168 (46) o PY79 (47); además se utilizó la cepa hipercompetente SCK6 (48). La cepa FG347/GFP:ZapA, *amyE::P_{xyI}-gfp-zapA (cat)* (20) se construyó previamente y fue amablemente donada por la Dra. Sarah Wacker del grupo de investigación del Dr. R. Losick. Se utilizaron los siguientes antibióticos, con su respectiva concentración (concentración final): cloranfenicol, 5 µg mL⁻¹; eritromicina, 1 µg mL⁻¹; kanamicina, 15 o 30 µg mL⁻¹; espectinomicina, 100 g mL⁻¹. El plásmido pSGGS, utilizado para generar las fusiones Spo0M:DsRed fue sintetizado por la compañía GenScript (Piscataway, NJ, EUA). Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se enumeran en la tabla 1. Los oligonucleótidos usados se agrupan en la tabla 2, y todos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

TABLA 1. CEPAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Cepa/Plásmido	Característica	Referencia
<i>Cepas</i>		
BS1A1	Cepa silvestre de <i>B. subtilis</i> derivada de la 168	(46)
SCK6	Em his nprE18 aprE3 eglS(DELTA)102 bglT/bglS(DELTA)EV <i>lacA::P_{xyI}A-comK</i>	(48)
Δ0M	<i>lacA::P_{xyI}A-comK (erm), spo0MD::kan</i>	Este trabajo
Spo0M:DsRed	<i>lacA::P_{xyI}A-comK (erm), spo0M-dsred (sp)</i>	Este trabajo
FG347/GFP:ZapA	<i>amyE::P_{xyI}-gfp-zapA (cat)</i>	(20)
GFP:ZapA:Δ0M	<i>amyE::P_{xyI}-gfp-zapA (cat), spo0MD::kan</i>	Este trabajo
GFP:ZapA/Spo0M:DsRed	<i>amyE::P_{xyI}-gfp-zapA (cat), spo0M-dsred (sp)</i>	Este trabajo
<i>Plásmidos</i>		
pUCm	Derivado de pUC19, con la región <i>lacZ</i> y <i>mcs</i> eliminado (amp)	Este trabajo

pSpo0MFla/ Construcción 1	pUCm, con el gen <i>spo0M</i> (amp)	Este trabajo
pΔ0M	<i>spo0MD::kan</i>	Este trabajo
pSGGS	<i>spo0M-dsred (sp)</i>	Este trabajo
pT7-MAT-FLAG	pT7:MATtag:MCS:FLAGtag (amp)	Comercial
pT7-Spo0M-FLAG	<i>spo0M:FLAGtag (amp)</i>	Este trabajo

TABLA 2. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.

Oligonucleótido	Secuencia
pUCmFw	TTA ACT GCA GAA CCA ATG CAT TGT ACA TTC AAA TAT GTA TCC GCT CA
pUCmRv	AAA GGG ATC CCG AGC CGG AAG CAT AAA GTG TAA AG
SpoFlaFw	TAA ACT GCA GAA CAA TGC ATT GCT AAA AAA ACA AAG GAG G
SpoFlaRv	TAT GGG ATC CCG CTC GGC ACC AAT TTT AC
SpoXIFw	AAT CCG CTC GAG CAA CGA CTC CTT TAT TTT CAA TAT TAT T
SpoKIIRv	AAT GGG GTA CCC GTC TAG GAT CTC TTC TAG CAC

CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Las cepas se cultivaron a 37°C con agitación, en medio rico Luria-Bertani (LB) (49), o medio de esporulación Spizizen (50) suplementados con 0.1% glucosa y 0.1% bacto casaminoácidos. Para cultivo en medio rico, se cultivó un preinóculo en 5mL de medio LB toda la noche (ON), se tomaron 0.5mL para inocular 5mL de medio LB (volumen final), se permitió llegar a la etapa de crecimiento exponencial (OD_{600} 0.6 – 0.8), y se calculó el volumen necesario para inocular 50 mL (volumen final) de medio LB para tener una OD_{600} de 0.1; Se incubó durante 24 h, tomando una muestra del cultivo cada hora y se determinó su OD_{600} . Para cultivo en medio de esporulación, se cultivó un preinóculo y se inocularó en medio LB, como se mencionó anteriormente, pero antes de determinar la OD_{600} del inóculo, las células se lavaron con medio Spizizen y se resuspendieron en el mismo, para eliminar las trazas de

medio rico. Después de esto, la estrategia seguida fue la misma. Se obtuvo el logaritmo base 10 de los valores de OD₆₀₀ obtenidos y se graficaron contra el tiempo para generar las curvas mostradas.

PRUEBAS DE ESPORULACIÓN

Para la cuantificación total de esporas, se obtuvo un preinóculo e inóculo de las cepas en medio LB, como se mencionó anteriormente, se lavaron y se resuspendieron en medio Spizizen, se llevaron a una OD₆₀₀ de 0.1 en 50mL del mismo medio, y se cultivaron durante 40 h a 37°C con agitación. Después de este tiempo, se tomaron 10µL de cada muestra y se montaron en un porta-objetos para su observación en un microscopio de campo claro. El número total de esporas se cuantificó manualmente, mediante la observación de 5 campos distintos de cada preparación; la cuantificación se realizó por triplicado para obtener un promedio y desviación estándar. Para las pruebas de resistencia de las esporas, se inocularon cajas de medio 2XSG de esporulación (51) con cada una de las cepas y se incubaron durante 6-8 días a 37°C. Después de este tiempo las células se obtuvieron por raspado y se recuperaron en 1mL de agua estéril. Las muestras se sonicaron 3 veces durante 30 segundos a 1800mA, enfriando en hielo 1 minuto entre cada vez. Se realizaron dos diluciones seriales de 1:1000 y se inocularon 100µL de la última dilución en cajas de agar LB con antibiótico, de cada una de las cepas. Se incubaron a 37°C durante 12-16 h y se cuantificó el número de esporas viables. Un total de 1e⁶ esporas de cada muestra se resuspendieron en 1mL de agua para cada prueba. Para la prueba de resistencia al calor húmedo, las muestras se incubaron a 80°C durante 30 minutos, se enfriaron en hielo 10 minutos y se inoculó 100µL de cada muestra en cajas de agar LB con antibiótico. Para la prueba de resistencia química, se adicionaron 1500 ppm de blanqueador comercial a cada muestra y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Se inoculó 100µL de cada muestra en cajas de agar LB con antibiótico. Las cajas se incubaron 12-16h a 37°C y se cuantificó el número de esporas viables. El experimento se hizo por triplicado para obtener un promedio y una desviación estándar.

GENERACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pUCm Y pΔ0M

Las enzimas *Taq* y *Phusion* DNA polimerasas (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) y Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim, Alemania) fueron usadas para las reacciones de PCR. Para la generación del plásmido pUCm, se diseñaron los oligonucleótidos pUCmFw y pUCmRv (Tabla 3), que contienen sitios de corte para las enzimas de restricción PstI y BamHI; el fragmento pUCm se obtuvo

por PCR. Usando los oligonucleótidos SpoFlaFw y SpoFlaRv (Tabla 3), con sitios de corte para las enzimas de restricción PstI y BamHI, se amplificó el fragmento SpoFla, que contiene al gen *spo0M* flanqueado por 500 pb río abajo y río arriba del gen. Ambos fragmentos se ligaron para generar la Construcción 1/pSpo0MFla (Fig. 5A). Esta construcción, se digirió con las enzimas de restricción HindIII y SacI, presentes en la secuencia de *spo0M*, y usando los mismos sitios de cortes se insertó el casete de resistencia a kanamicina para interrumpir el gen y generar el plásmido p Δ 0M (Fig. 5B). Las construcciones se obtuvieron en la cepa DH5- α de *E. coli*, utilizando métodos estándar (52); el plásmido p Δ 0M se transformó en las cepas deseadas para generar las mutantes nulas de *spo0M*, mediante el método “long-flanking PCR” y recombinación homóloga (53).

GENERACIÓN DEL PLÁSMIDO pT7-Spo0M-FLAG

Se amplificó la secuencia de *spo0M* desde el 5' del gen y sin terminador, usando los oligonucleótidos SpoXIFw y SpoKIIRv, que contienen sitios de corte para las enzimas de restricción XhoI y KpnI. Se digirió con las mismas enzimas el vector comercial pT7-MAT-FLAG y los dos fragmentos se ligaron para generar el vector de expresión pT7-Spo0M-FLAG (Fig. 15A). La construcción se obtuvo en la cepa DH5- α de *E. coli*, y se transformó en la cepa BL21-DE3 de *E. coli*, para la expresión de la proteína de fusión. Para la expresión, se obtuvo un preinóculo ON de la cepa Spo0M-FLAG en medio LB, se tomaron 0.5mL de este para inocular 5mL (volumen final) de medio LB y se llevaron a una OD₆₀₀ de 0.6-0.8. Se tomó el volumen necesario del cultivo para inocular 50mL (volumen final) de medio LB a una OD₆₀₀ de 0.1, y se llevó a una OD₆₀₀ de 0.6. Se adicionó al cultivo 0.5 mM de IPTG (concentración final) y se incubó durante 6-8 h a 37°C con agitación.

TRANSFORMACIÓN DE LAS CEPAS DE *B. subtilis*

Las células competentes de *B. subtilis* se prepararon con ligeras variaciones de los métodos convencionales (54). Brevemente, se obtuvieron preinóculos e inóculos de las cepas en medio LB, como se describió previamente, las células se lavaron y se resuspendieron en 5mL medio Spizizen, se determinó su OD₆₀₀ y se inoculó el volumen necesario para llevar 50mL (volumen final) del mismo medio a una OD₆₀₀ de 0.1. Se incubó a 37°C con agitación hasta llevar a una OD₆₀₀ de 1.0, se tomaron 3-5mL del cultivo y se centrifugó para eliminar el medio, las células se resuspendieron en 50 μ L de glicerol al 65% estéril y se mantuvieron en frío. Se obtuvieron 6-8 μ g totales del inserto que se desea

transformar, y se linearizaron mediante digestión enzimática. El inserto linearizado (20 μ L volumen final) se añadió a la suspensión de células en glicerol y se electroporó a 1.8 kV. Las células se recuperaron en 1mL de medio SOC (55) y se incubaron a 37°C con agitación durante 2-4 h. 200 μ L del cultivo se platearon en placas de agar LB con antibiótico.

MICROSCOPIA

Las células de los cultivos deseados se fijaron de ser necesario con p-formaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X, 10 min a TA, se lavaron 3 veces con PBS 1X y se tiñeron con 0.01 mg mL⁻¹ de FM4-64 (F34653, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (concentración final), 0.01 mg mL⁻¹ Hoechst 33342 (H3570, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) o 0.01 mg mL⁻¹ de 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida (DAPI) (D1306, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (concentración final). Las células se observaron con un microscopio confocal Olympus FV1000 IX81 utilizando un objetivo UPLSAPO 60XS/1.3 Ph3 de inmersión en aceite tipo silicón. La luz azul (DAPI) y roja (FM4-64 o DsRed) se excitó con láseres de estado sólido de 405 o 543 nm, respectivamente. La intensidad máxima del láser, alcanzó entre 20 y 250 mW, dependiendo de la línea del láser usada. Un cubo láser multi-banda fue usado para discriminar las fuentes de luz (BA430-470, BA560-660, SDM490 y DM 405 A-OMF, Bright Line; Semrock). Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron siempre con las mismas condiciones del hardware (cámara EMCCD (Ixon 897, Andor); la apertura del colimador de orificio delimitante –pinhole- fue de 200 μ m; el voltaje del fotomultiplicador para 405 nm fue de 517 V y para 543 nm de 866 V, con una ganancia analógica de 1; se obtuvieron 10 imágenes cada vez con una velocidad de escaneo 4 ms y un intervalo de ciclado de 250 ms; el tamaño efectivo del pixel fue de 100 nm y tamaño total de la imagen de 800 X 800 pixeles) en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software de distribución abierta Fiji–ImageJ (56).

MICROSCOPIA DE SÚPER RESOLUCIÓN.

La adquisición de imágenes para el análisis por microscopía de súper resolución fue hecha en un microscopio Olympus IX-81 invertido, configurado para excitación por fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) (cellTIRF Illuminator; Olympus). El ángulo de excitación se estableció para permitir que el campo de evanescencia tuviera una profundidad de aproximadamente 500 nm (Xcellense software v1.2; Olympus Soft Imaging Solution GMBH). Las muestras fueron iluminadas

de manera continua usando una fuente de excitación dependiente del fluoróforo analizado. La luz azul (Hoechst), verde (GFP), y roja (FM4-64 y DsRed) se excitó con láseres de estado sólido de 405, 491 o 568 nm, respectivamente. La intensidad máxima del láser, medida en el fondo del plano focal de la lente del objetivo, alcanzó entre 20 y 25 mW, dependiendo de la línea del láser usada. El haz seleccionado y la modulación de la intensidad del láser fue controlada a través del software Xcellence v.1.2. Un cubo láser multi-banda completo fue usado para discriminar las fuentes de luz (LF 405/488/561/635 A-OMF, Bright Line; Semrock). La fluorescencia se colectó mediante un objetivo Olympus UApo N 100x/1.49 NA de inmersión en aceite, con un lente intermedio de magnificación 1.6x. Las imágenes de sub-difracción se derivaron mediante un análisis de Fluctuación Radial de Súper Resolución (del Inglés, *Super Resolution Radial Fluctuation*, SRRF) (57). Para cada reconstrucción de súper resolución (en los planos x, y, z), se hizo la adquisición de cinco a diez planos seriales dentro del campo de evanescencia, con un espaciado axial 'z' de 100 nm. Cada plano serial, compuesto de 300 imágenes temporales fue colectado con un tiempo de exposición de 5 – 10 ms a la tasa de máximo rendimiento de la cámara, que para este experimento equivale a 6 – 7 Hz. Cada planos serial fue analizado por los complementos Nano-J core y Nano-SRRF (57) del software Fiji–ImageJ (56). Los siguientes parámetros fueron considerados: radio de anillo 0.5, magnificación radial 10, ejes en el anillo 10; todos los parámetros restantes se fijaron por default. Los desvíos de los mapas de radialidad fueron integrados en una imagen de súper resolución mediante el cálculo del acumulado de segundo orden de las auto-correlaciones de la radialidad temporal. Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron siempre con las mismas condiciones del hardware (cámara EMCCD (Ixon 897, Andor); ganancia analógica/digital -A/D- 1 o 2; ganancia de multiplicación electrónica 300; se obtuvieron 300 imágenes cada vez con un intervalo de ciclado de 150 ms entre imágenes en cada canal, con una imagen en cada canal por cada tres imágenes; el tamaño efectivo del pixel es de 100nm y el tamaño total de la imagen de 512 X 512 pixeles) en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software de distribución abierta Fiji–ImageJ (56).

SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

Las muestras de proteína total se obtuvieron partiendo de los cultivos de interés, eliminando el medio por centrifugación y resuspendiendo en 50-100µL de buffer de lisis (50 mM HEPES, pH 7.4; 2.5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 1% NP40; coctel de inhibidor de proteasas (Roche); coctel de inhibidor de fosfatasa (Roche)). Las muestras se sonicaron 3 veces durante 30 segundos, enfriando en hielo 1 minuto entre cada vez, y se centrifugaron durante 30 minutos a velocidad máxima, a 4°C. La proteína total se cuantificó mediante el método de Bradford (58) y se utilizaron 30-40µg total para el

análisis. El SDS-PAGE se realizó de acuerdo a lo reportado por Laemmli (59). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se bloquearon con leche en polvo comercial durante 30 minutos a la concentración específica para cada anticuerpo (5-10%). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios comerciales: anti-FtsZ (AP10076PU-N, Agrisera, Vänäs, Suecia), anti-GFP (GTX113617, GeneTex, Alton Pkwy, Irvine, CA, EUA), anti-DsRed (GTX59862, GeneTex), anti-DsRed (GTX82561, GeneTex) y anti-FLAG (F1804, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Los anticuerpos primarios se detectaron utilizando anticuerpos secundarios acoplados a HRP, seguido de una detección por quimioluminiscencia (ECL; GE, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

INTERACTOMA

Se obtuvo un extracto total de proteínas de la cepa Spo0M-FLAG inducida, con los protocolos mencionados anteriormente, además, se obtuvo un extracto total de proteína de la cepa silvestre Bs1A1 de 8, 10 y 12 h de cultivo en medio rico, y se permitió la interacción de los extractos (Spo0M-FLAG + muestra de cada tiempo) durante 2 h a 4°C. Como control, se obtuvo un extracto total de una cepa de *E. coli* BL21-DE3 que contenía el vector vacío pT7-MAT-FLAG y se siguió el mismo procedimiento que con la cepa Spo0M-FLAG. Después de la interacción, las mezclas se incubaron con una columna de perlas de agarosa acopladas a un anticuerpo anti FLAG (A2220 Sigma-Aldrich) durante 2 h a 4°C. Las perlas se lavaron 3 veces con buffer de lisis y se resuspendieron en 15 µL de buffer de carga 4X, se hirvieron durante 5 minutos y se corrieron en un SDS-PAGE. El gel se tiñó con el colorante azul de Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (161-0436 BioRad, Hércules, CA, EUA) y se analizó para identificar bandas diferenciales entre la muestra control y las muestras problema. Se obtuvieron 3 réplicas biológicas del experimento y las bandas diferenciales identificadas se enviaron a analizar por espectrometría de masas a la Plataforma Discovery de Proteómica en el Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal, Canadá. Los resultados se analizaron utilizando el software comercial Scaffold 4.4.7 (60).

CITOMETRÍA DE FLUJO DE IMAGEN

La formación del septo en las cepas analizadas se analizó mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la fusión GFP:ZapA utilizando un citómetro de flujo Amnis Image Stream Mark II.

Las células de las cepas GFP:ZapA y GFP:ZapA: Δ 0M se cultivaron en medio rico hasta la fase exponencial (OD_{600} 0.6-0.8) y la inducción del reportero del septo se indujo mediante la adición de 0.1% xilosa (concentración final) por 4h. Se tomaron muestras de 1 mL de cada cultivo y se corrieron hasta que 5×10^3 células fueron cuantificadas para cada repetición biológica. Las células se observaron utilizando un objetivo Olympus 60X/0.9 NA con una tasa de flujo de 44 mm/s y una tasa de adquisición de imágenes de 1200 cel/s. La luz verde se excitó utilizando un láser de estado sólido de 488 nm, con una intensidad máxima de 175mW. Los datos reportados corresponden al promedio de tres repeticiones biológicas.

EXPERIMENTOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación con proteína intrínseca y de producción heteróloga. Para los experimentos con proteína intrínseca, se obtuvieron extractos totales de proteína de las cepas Spo0:DsRed o GFP:ZapA/Spo0M:DsRed inducida con 0.1% de xilosa. Se permitió la interacción de 1 μ g total de proteína con una dilución 1:1000 de anticuerpo anti-DsRed durante 3h a 4°C. Después de este tiempo, la mezcla se incubó con 20 μ L de perlas de proteína A sefarosa (sc-2001, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, U.S.) durante 3h a 4°C. Las perlas se lavaron 3 veces con buffer de lisis. Como control se utilizó 1 μ g del extracto total de proteína mencionado, incubado con un anticuerpo inespecífico y con perlas de proteína A sefarosa. Las perlas tratadas y control se resuspendieron en 15 μ L de buffer de carga 4X, se hirvieron durante 5 minutos y se corrieron en un SDS-PAGE. La presencia de FtsZ o GFP-ZapA se determinó mediante WB utilizando anticuerpos anti-FtsZ o anti-GFP. Para los experimentos de co-inmunoprecipitación con proteína de producción heteróloga se obtuvo un extracto total de proteína de la cepa Spo0M-FLAG inducida, como se mencionó previamente y se permitió la unión de 1 μ g total de este extracto con perlas de agarosa acopladas al anticuerpo anti-FLAG durante 3 h a 4°C. Se permitió la interacción con el complejo perlas-Spo0M-FLAG con extractos totales de proteína de las cepas Bs1A1 o GFP:ZapA inducida, durante 3 h a 4°C. La columna se lavó 3 veces con buffer de lisis. Como control, se utilizó el extracto total de una cepa que contenía el vector pT7-MAT-FLAG vacío, al igual que en el experimento anterior. Las perlas tratadas y control se resuspendieron en 15 μ L de buffer de carga 4X, se hirvieron durante 5 minutos y se corrieron en un SDS-PAGE. Como control se analizaron muestras del lisado total de proteínas de la cepa de *E. coli* Spo0M-FLAG y de las cepas Bs1A1 o GFP:ZapA de *B. subtilis*. La interacción se analizó mediante WB utilizando anticuerpos comerciales anti FtsZ o anti GFP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

GENERACIÓN Y ANÁLISIS FISIOLÓGICO Y FENOTÍPICO DE UNA MUTANTE NULA EN *spo0M*

La información con la que se cuenta acerca de la función y la regulación de Spo0M es muy limitada. Previamente, se ha definido como un regulador de la esporulación (31), sin embargo el mecanismo por el que lleva a cabo esta función no se ha identificado, y no hay reportes que la relacionen con ningún otro proceso en la vida vegetativa de *B. subtilis*. El primer paso para la caracterización funcional de esta proteína fue la generación de una cepa nula en *spo0M*. Esta mutante se generó mediante la interrupción del gen por inserción de un casete de resistencia a antibiótico (Fig. 5). Inicialmente, se generó el vector pUCm (ver Metodología), modificando el vector comercial pUC19 mediante enzimas de restricción, para eliminar la región de *lacZ* con el sitio de multiclonación. Este vector se utilizó para generar la Construcción 1 (Fig. 5A), al clonar el gen *spo0M*, flanqueado por 500 pb río arriba y río abajo del gen, amplificando mediante PCR a partir de DNA genómico de la cepa Bs1A1. Una vez clonado el gen *spo0m*, se utilizaron sitios de restricción internos del gen para interrumpirlo e insertar en su secuencia un casete de kanamicina, generando el vector pΔOM (Fig. 5B). Este vector se transformó en la cepa hipercompetente de *B. subtilis*, SCK6, para generar la cepa nula ΔOM. La generación de la cepa ΔOM se verificó por secuenciación y PCR, en donde se observa que el tamaño del fragmento de DNA amplificado con los oligonucleótidos específicos para *spo0M* se incrementa por la presencia del casete de kanamicina (Fig. 5C).

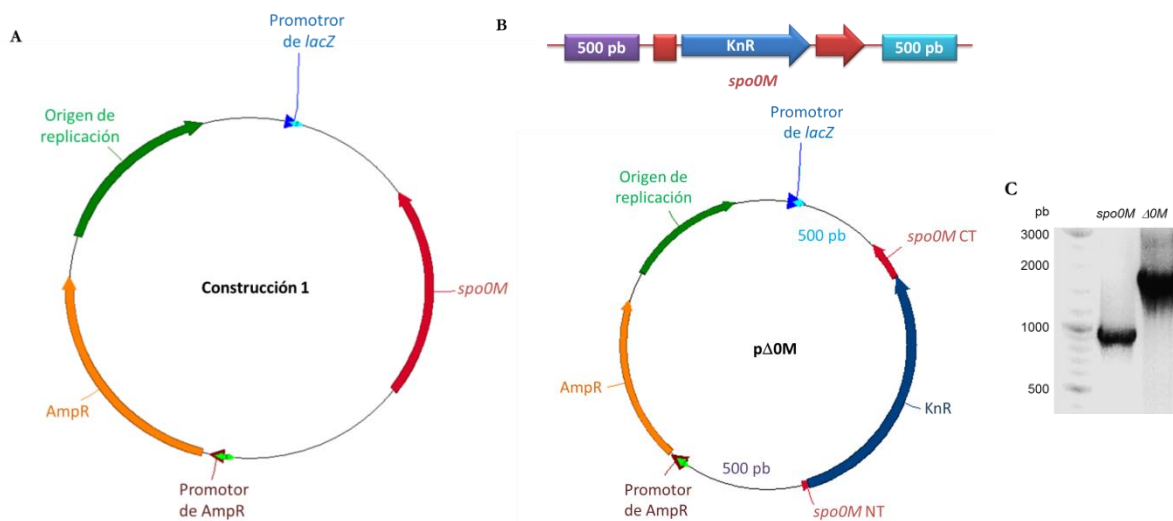


Figura 5. INTERRUPCIÓN DEL GEN DE *spo0M* CON UN CASETE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICO, PARA LA GENERACIÓN DE UNA CEPA MUTANTE $\Delta 0M$. **A.** Se generó la Construcción 1, que contiene al gen *spo0M* en el vector pUCm. **B.** Se utilizaron sitios de restricción internos de *spo0M* para la inserción de un casete de kanamicina. **C.** Fotografía de un gel de agarosa 1%, en donde se observa la amplificación por PCR del gen *spo0M* (~900pb) y la amplificación usando los mismos oligonucleótidos del gen interrumpido por el casete de kanamicina (~1700pb). AmpR. Casete de resistencia a ampicilina. KnR. Casete de resistencia a kanamicina. NT. Región N terminal (5') del gen. CT. Región C terminal (3') del gen.

Se realizaron cinéticas de crecimiento en medio rico (Fig. 6A) y medio de esporulación (Spizizen) (Fig. 6B) (ver Metodología) de la cepa mutante y la cepa parental. El resultado mostró que no existen diferencias significativas en el crecimiento de estas cepas, en ninguno de los medios estudiados, lo que hace suponer que Spo0M no está involucrada en el metabolismo de la célula.

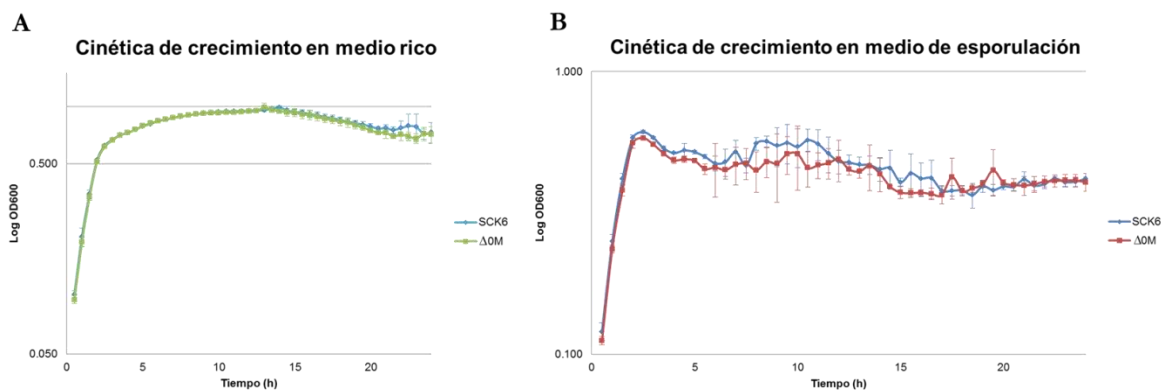


Figura 6. COMPARACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTE EN *spo0M*. Las cepas SCK6 (silvestre en *spo0M*) y $\Delta 0M$ se incubaron 24 horas en medio rico (**A**) y medio de esporulación (**B**) (ver Metodología). Se muestran las cinéticas de crecimiento obtenidas al graficar el logaritmo base 10 de la OD₆₀₀ contra el tiempo. No existen diferencias significativas en el crecimiento de las cepas en ninguno de los dos medios. Los resultados muestran el promedio de tres repeticiones biológicas. Las barras de error representan las desviaciones estándar de cada punto.

Se cuantificó manualmente el número de esporas totales producidas por ambas cepas, después de incubadas en medio de esporulación durante 40 h a 37°C. La cepa mutante produce entre 25-30% menos esporas que la cepa parental (Fig. 7A). Se analizó además la cantidad total de esporas producidas por la cepa silvestre Bs1A1 (*B. subtilis* 168), para determinar si el porcentaje de esporulación de esta cepa era comparable con el obtenido para la cepa parental SCK6. Como se muestra en la figura 7A los

porcentajes de esporulación son prácticamente los mismos, por lo que puede considerarse la cepa parental SCK6 como cepa silvestre para fines prácticos de este trabajo.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de resistencia de las esporas a calor húmedo y a la exposición a químicos (ver Metodología) y se determinó que las esporas producidas por la cepa mutante son menos resistentes a ambos tratamientos que las producidas por la cepa silvestre (Fig. 7B). La resistencia de las esporas es mayor a calor húmedo que al tratamiento químico para ambas cepas analizadas.

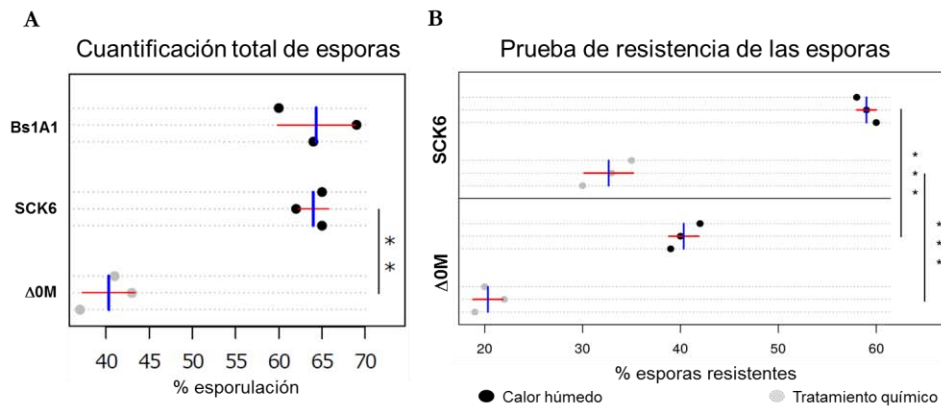


Figura 7. ANÁLISIS DE LA ESPORULACIÓN EN LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTE EN *spo0M*. **A.** Se cuantificó manualmente el número total de esporas producidas por las cepas Bs1A1, SCK6 y Δ0M, después de un cultivo en medio de esporulación durante 40 h. El porcentaje total de esporas producidas por las cepas Bs1A1 y SCK6 es equivalente. La cepa mutante en *spo0M* produce entre 25-30% menos esporas. **B.** Se hizo un análisis de la resistencia de las esporas generadas por las cepas SCK6 y Δ0M a tratamientos con calor húmedo y químicos. Las esporas producidas por la cepa silvestre son más resistentes a ambos tratamientos que las esporas producidas por la cepa mutante. Los datos fueron analizados mediante una prueba ANOVA con un *p value* de 0.001; las barras azules representan el valor promedio y las barras rojas la desviación estándar.

Estos resultados muestran que tanto la cantidad como la calidad de las esporas de la cepa mutante están alterados y demuestran la participación de Spo0M en los procesos de esporulación de *B. subtilis*, de acuerdo a lo reportado en la bibliografía. Se sabe que la resistencia al calor húmedo de las esporas está determinada principalmente por el contenido de agua del *core*; entre menor es el contenido de agua, mayor es la resistencia de la spora. Además, influye el contenido de iones y proteínas SASPs, que se asocian con el DNA en la spora (61). El daño químico a las esporas por ácidos y agentes oxidantes ocurre por afectaciones a la membrana interna, que normalmente es altamente impermeable, incluso a moléculas muy pequeñas. La asociación de ciertas SASPs con el DNA también está relacionada con la resistencia química de las esporas (61). La síntesis de las SASPs es dependiente de σ^G y ocurre en las etapas III y IV del proceso (3). Han y col., reportaron previamente que la mutante nula en *spo0M* está

alterada en la etapa cero de la esporulación, sin embargo, nuestros resultados sugieren que Spo0M podría estar involucrada incluso en etapas más tardías de este proceso.

Se analizó el fenotipo de la cepa mutante y se comparó con el de la cepa silvestre, mediante observación en un microscopio de campo claro. Como se muestra en la figura 8, las células mutantes presentan un fenotipo de células alargadas. La distribución de longitud de las células de la cepa parental es significativamente distinta que la de la cepa mutante; el promedio de longitud de las células silvestres es $2.85 \pm 0.95 \mu\text{m}$ (N=243), mientras que la cepa mutante produce cerca de un 30% de células alargadas con un promedio de longitud de $11.10 \pm 5.16 \mu\text{m}$ (N=193) (Fig. 8).

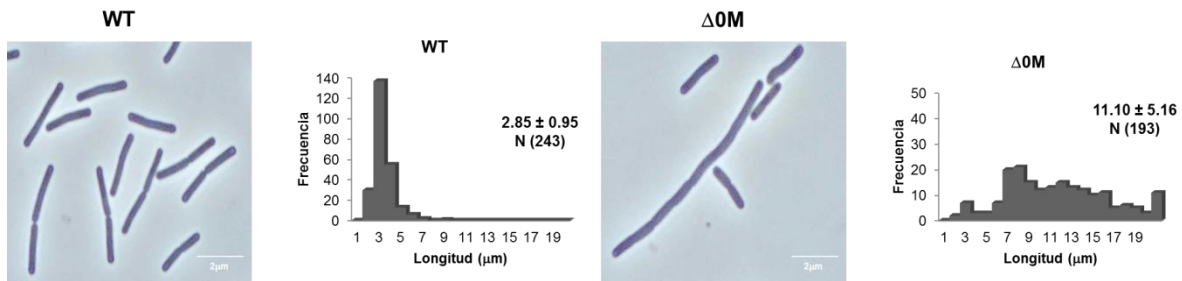


Figura 8. LA CEPA MUTANTE EN *spo0M* PRESENTA UN FENOTIPO FILAMENTOSO DURANTE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO. Las células de la cepa silvestre y mutante se observaron en un microscopio de campo claro después de cultivarse en medio rico; se observó que las células mutantes miden entre 3-5 veces más que las células silvestres. Las células se incubaron en medio rico hasta llevar al cultivo a la etapa de crecimiento exponencial (OD_{600} 0.6-0.8) y se colocó una muestra de $10 \mu\text{L}$ de cultivo sobre un portaobjetos; la muestra se observó con un objetivo de inmersión en aceite 100X. La longitud de las células se determinó utilizando el programa Fiji-ImageJ (56).

Para definir en forma más detallada su morfología, las células se tiñeron con el colorante de membrana FM4-64 y el marcador de DNA DAPI (ver Metodología), y se observaron en un microscopio confocal (Fig. 9) (ver Metodología). Se determinó que las células mutantes presentan diferencias morfológicas claras con respecto a las células silvestres: además de ser alargadas, las células mutantes presentan diferencias en la morfología de la membrana, que aparece curvada (Fig. 9A), y en la distribución del cromosoma, presentando paquetes de DNA anormalmente largos, de apariencia decondensada o guillotizada (Fig. 9B).

Esto hace pensar en una posible función de Spo0M en el proceso de división celular de la bacteria, debido a que la ausencia de proteínas involucradas en este proceso, como FtsZ, FtsA, EzrA o SepF, genera un fenotipo similar de células filamentosas (12, 19, 21, 23). Adicionalmente, podría sugerir el rol

de Spo0M en la organización de la membrana plasmática, que en el caso de *B. subtilis* está determinada por la presencia de dominios funcionales de membrana, regulados por las proteínas homólogas de las flotilinas eucariotas FloA y FloT (62); o en la correcta segregación y posicionamiento de los cromosomas durante la división, que se encuentra bajo la regulación de los sistemas NOC y MinCD (15, 17).

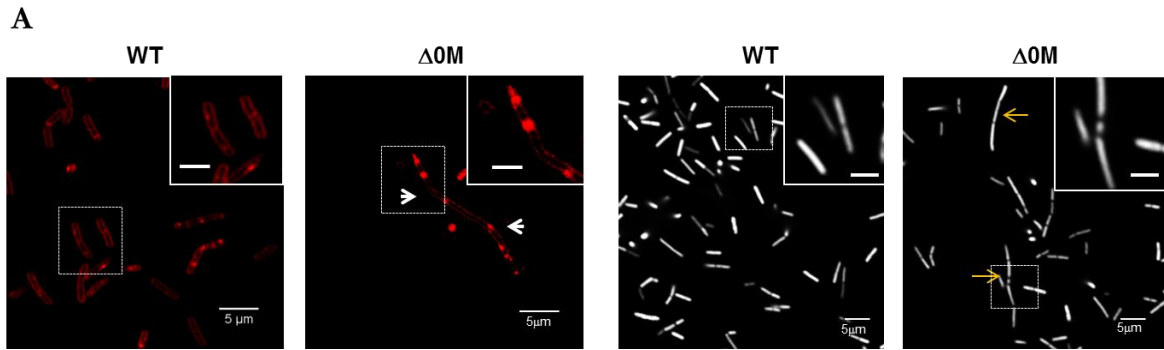


Figura 9. DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS ENTRE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTE EN *spo0M*. Las células de ambas cepas fueron cultivadas en medio rico hasta la fase exponencial de crecimiento, se fijaron y se tiñeron con el colorante de membrana FM4-64 y el marcador de DNA DAPI. Fotografías obtenidas mediante un microscopio confocal de fluorescencia. Las células mutantes muestran diferencias morfológicas comparadas con las células silvestres, como **A.** anomalías en la membrana plasmática, como puntos o acumulaciones y regiones curvadas (flechas blancas), o **B.** diferencias en el empaquetamiento del DNA que aparece en paquetes de apariencia decondensada o guillotínada (flechas amarillas).

El proceso de división celular es un proceso complejo que involucra un gran número de proteínas. Como se mencionó anteriormente, tanto la división medial como la esporulación se inician con la formación de un septo, lo que constituye el paso desencadenante para ambos procesos. Se decidió analizar si Spo0M podría estar involucrada en el ensamble o posicionamiento del septo durante la división, tanto en la fase de crecimiento vegetativo como en la esporulación de *B. subtilis*. Para el análisis de la localización del septo, se cuenta con la cepa reportera FG347 (GFP:ZapA) (Tabla 1), que contiene una fusión fluorescente de la proteína reportera GFP con la proteína del septo ZapA en el locus de *amyE*, inducible por xilosa (ver Metodología), cuyo seguimiento es equivalente al seguimiento directo del anillo Z, por su colocalización con este elemento del divisoma (20).

Para analizar cómo ocurre la formación y localización del septo en presencia y ausencia de *spo0M*, la cepa GFP:ZapA se transformó con el vector ptΔ0M, para generar la cepa nula en *spo0M* en este fondo genético; a esta cepa se le denominó GFP:ZapA:Δ0M. La generación de la cepa se verificó por PCR (Fig. 10A). Se analizó el crecimiento de esta cepa en medio rico (Fig. 10B) y en medio de esporulación

(Fig. 10C), y se corroboró que tampoco en este fondo genético existen diferencias significativas en el crecimiento de las cepas, en ninguno de los dos medios. Adicionalmente se analizó el porcentaje total de esporulación y se hizo una prueba de resistencia de las esporas generadas por la cepa parental y la cepa nula en *spo0M*, tal y como se hizo para las cepas en el fondo genético de la cepa SCK6. Se verificó que la cepa mutante produce aproximadamente 30% menos esporas que la cepa silvestre (Fig. 10D) y que estas esporas son menos resistentes a calor húmedo y a tratamiento químico que las producidas por la cepa silvestre (Fig. 10E). Al analizar el fenotipo de la cepa mutante en este fondo genético, se observó que también presentan un fenotipo de células alargadas (Fig. 10F), presentando un promedio de longitud de $16.22 \pm 7.24 \mu\text{m}$.

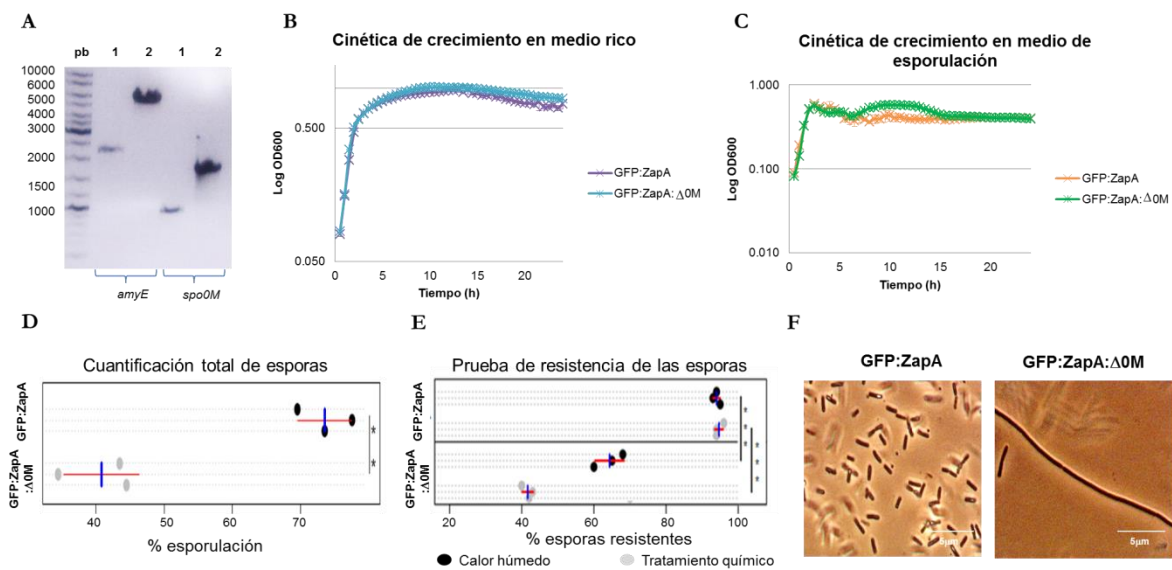


Figura 10. GENERACIÓN DE LA CEPA MUTANTE GFP:ZapA:Δ0M. Se utilizó el vector pΔ0M para transformar la cepa GFP:ZapA, generando así la cepa nula en *spo0M* en este fondo genético. **A.** Fotografía de un gel de agarosa, en donde se muestra la amplificación por PCR de las bandas para los genes *amyE* y *spo0M* silvestres (1. DNA genómico de la cepa silvestre Bs1A1) y mutantes (2. DNA genómico de la cepa GFP:ZapA:Δ0M). Los tamaños esperados son: *amyE* silvestre, 2100pb; *amyE* mutante, 6000pb; *spo0M*, 900pb; Δ0M, 1700pb. **B.** Cinética de crecimiento en medio rico de las cepas silvestre y mutante en *spo0M*. **C.** Cinética de crecimiento en medio de esporulación de las cepas silvestre y mutante en *spo0M*. No hay diferencias significativas en el crecimiento de ambas cepas, en ninguno de los medios. Los resultados representan el promedio de tres repeticiones biológicas. **D.** Cuantificación total de las esporas de las cepas silvestre y mutante. Al igual que en el fondo genético de la cepa SCK6, la producción total de esporas de la cepa mutante (círculos grises) es menor que la cepa silvestre (círculos negros). **E.** Prueba de resistencia de las esporas de las cepas analizadas. Las esporas generadas por la cepa mutante en *spo0M* son menos resistentes al calor húmedo y al tratamiento químico que las cepas producidas por la cepa parental. Los datos fueron analizados mediante una prueba ANOVA con un *p value* de 0.001; las barras azules representan el valor promedio y las barras rojas la desviación estándar. **F.** Fotografía de microscopía de campo claro, en donde se muestra que también en este fondo genético, la cepa nula de *spo0M* presenta células que son de 4-6 veces más largas que las células silvestres. Las barras de error representan la desviación estándar.

A continuación, se realizó la inducción de la fusión fluorescente, adicionando al cultivo 0.1% de xilosa (concentración final) (ver Metodología). Se corroboró que la inducción del reportero fluorescente de la proteína del septo es funcional en ambas cepas, utilizando citometría de flujo de imagen (ver Metodología). Se determinó el porcentaje de células que presentan fluorescencia, que es atribuible a la señal de la fusión GFP:ZapA y se relaciona con la presencia de un septo en la célula. Fue posible determinar que los septos se forman en la misma proporción en ambas cepas, $53.8 \pm 4.4\%$ en la cepa silvestre y $51.8 \pm 5.7\%$ en la cepa mutante (Fig. 11A).

El resultado muestra que la formación del septo no está alterada en las mutantes $\Delta 0M$, ya que ocurre en la misma tasa que en las células silvestres, sin embargo, es importante mencionar que la presencia de los septos en las células se obtuvo por una correlación con el análisis de la señal de fluorescencia, obtenido mediante la citometría de flujo de imagen, esto es, en la figura 11A se reporta el porcentaje total de células que presentan fluorescencia en las células silvestres y mutantes. Por las condiciones del experimento, los valores reportados podrían no corresponder exactamente con el porcentaje total de septos. Primero, la proteína del reportero del septo no es la más adecuada para el análisis en un citómetro de flujo de imagen, ya que es ZapA es una proteína membranal y la señal de fluorescencia detectada por el aparato no proviene exclusivamente del septo, sino es una suma de la señal membranal y la señal del septo. El uso de FtsZ como reportero del septo habría generado menos señal inespecífica en las lecturas del citómetro, debido a que FtsZ es una proteína citoplásmica que únicamente polimeriza en la región del septo durante la división celular. Desafortunadamente, no fue posible utilizar FtsZ debido a que la inducción de la fusión fluorescente no se obtuvo en la cepa mutante y no habría sido posible la comparación. Segundo, la magnificación máxima que puede obtenerse en el aparato es de 60X, que no es óptimo para el análisis de localización celular de una proteína en una célula bacteriana.

A pesar de estas limitantes, considero que el uso del citómetro de flujo de imagen en este trabajo fue de utilidad, ya que permitió corroborar datos obtenidos por un conteo manual de septos en imágenes de microscopía confocal, utilizando el software Fiji-ImageJ (56), que revelaron que la proporción de células con septos en las células silvestres ($26.56 \pm 5.98\%$) es la misma que en las células mutantes (22.79 ± 5.90). La diferencia del porcentaje de células con fluorescencia de cerca del 20% que existe con los datos obtenidos en el citómetro podría corresponder a la señal adicional que existe en la membrana. Considero que la determinación del porcentaje de células que presentan un septo en el citómetro de flujo de imagen sería más precisa utilizando una proteína citoplásmica que genera una señal fluorescente

intensa únicamente cuando polimeriza en el septo, como FtsZ, utilizando un marcaje doble de dos diferentes proteínas que colocan en el septo e incrementando la magnificación alcanzada por el aparato.

Utilizando microscopía de súper resolución se observó que, comparadas con las células silvestres (Fig. 11B) las células de la cepa $\Delta 0M$ forman cadenas de bacilos de tamaño no uniforme, conteniendo varios paquetes de DNA (Fig. 11C), y estos paquetes tienen apariencia decondensada, cuando se mide su diámetro y se compara con el DNA presente en las células silvestres (Fig. 11D). A pesar de las diferencias morfológicas observadas en las células mutantes, los septos están presentes incluso en las células alargadas (Fig. 11B y C), lo que nos hace suponer que el defecto en la división celular provocado por la mutación en *spo0M* ocurre después del establecimiento de las proteínas primarias del septo.

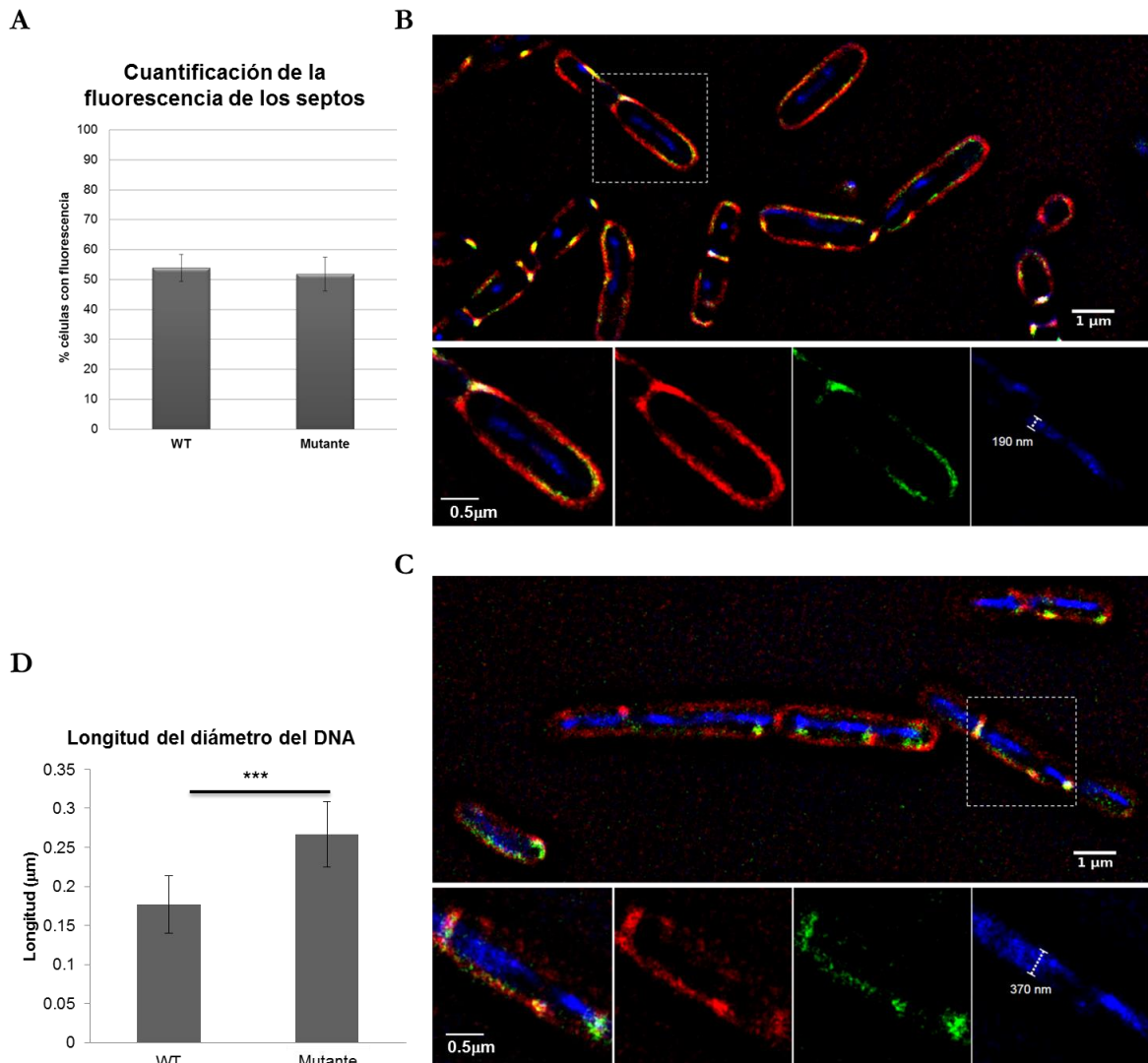


Figura 11. DIFERENCIAS EN EL POSICIONAMIENTO DE LOS SEPTOS ENTRE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTE EN *spo0M*. **A.** Cuantificación de la fluorescencia de los septos. Las cepas GFP:ZapA y GFP:ZapA: Δ 0M se cultivaron en medio rico hasta la fase exponencial y la expresión de la fusión GFP:ZapA se indujo con 0.1% de xilosa. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo de imagen (ver Metodología) y se relaciona con el porcentaje de células que presentan un septo. Las barras de error representan la desviación estándar. **B.** y **C.** Fotografías de microscopía de súper resolución de las cepas silvestre (**B**) mutante en *spo0M* (**C**) con la fusión GFP:ZapA inducida. Las células se cultivaron en medio rico hasta la fase exponencial, se indujeron con 0.1% de xilosa, se tiñeron con el marcador de membrana FM4-64 y con el marcador de DNA Hoechst. Es posible observar que las células mutantes forman cadenas de bacilos que contienen más de un paquete de DNA; al medir el diámetro de los paquetes de DNA se observa que es mayor el de las células mutantes, lo que le otorga una apariencia decondensada. Los septos están presentes en ambas cepas. **D.** Comparación de la longitud del diámetro de los paquetes de DNA presentes en las células silvestres y mutantes. La longitud de los diámetros entre las dos cepas es significativamente distinta. Los datos fueron analizados mediante una prueba t de Student de dos colas para datos con igual varianza y el *p value* obtenido fue de 4.57E-58. Las imágenes fueron analizadas con el software Fiji-ImageJ (56).

Este resultado sugiere que el anillo Z podría estar ensamblándose de manera correcta, sin embargo, su posicionamiento y/o constricción podrían ser inefficientes. Un fenotipo similar se observa en una mutante nula en *ftsA*, que presenta un fenotipo filamentoso debido a la alteración en el ensamble de nuevos septos o la formación de septos que no son estables y no se constriñen para permitir la separación de las células (63). Adicionalmente nuestro resultado podría sugerir la participación de los mecanismos regulatorios para el posicionamiento correcto del septo que, como se mencionó anteriormente, está a cargo de los sistemas NOC y MinCD, que evitan la formación de septos aberrantes en regiones de la célula (17). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que Spo0M está involucrado en la etapa de vida vegetativa de la bacteria y no sólo en el proceso de esporulación. Nuestros datos apuntan hacia la participación de Spo0M en el proceso de división celular.

Adicionalmente, se observó que el empaquetamiento del DNA en las células mutantes no es igual al de las células silvestres, mostrando una apariencia decondensada, que se corrobora al hacer una comparación de los diámetros entre los paquetes de DNA de cada una de estas cepas (Fig. 11B, C y D). Un defecto en el empaquetamiento del DNA podría provocar un retraso en la división celular, lo que llevaría al crecimiento anormal de las células observado en la mutante de *spo0M*. Spo0M podría ser el vínculo entre proteínas involucradas en el empaquetamiento y la segregación del DNA y proteínas de la división celular. Es necesario realizar más experimentos para probar esta hipótesis.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE Spo0M

Los patrones de localización de diversas proteínas pueden estar relacionados con su funcionalidad, un claro ejemplo son las proteínas de la cascada de esporulación de *B. subtilis*, cuya expresión y activación en distintos compartimentos (la célula madre o la pre-espora) facilita los procesos regulatorios en los que están involucradas. Para determinar si algo similar ocurre con la localización de Spo0M, se generó la construcción Spo0M:DsRed, en los dos fondos genéticos utilizados anteriormente, SCK6 y GFP:ZapA. Para ello, se transformó el vector pSGGS (ver Metodología) en las cepas Δ OM y GFP:ZapA: Δ OM, utilizando como regiones de recombinación homóloga 500pb río arriba de *spo0M* y 500pb del extremo C terminal del casete de resistencia a kanamicina (Fig. 12A). La generación de estas cepas se verificó por análisis de restricción, PCR (Fig. 12B) y secuenciación. Además, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio rico (Fig. 12C) y medio de esporulación (Fig. 12D), y se observó que no existen diferencias significativas en el crecimiento de las cepas, comparadas con las cepas parentales, en cualquiera de los dos medios. Esto confirma que, ni la ausencia de *spo0M*, ni su modificación en el N terminal, tienen efectos sobre el crecimiento de *B. subtilis*.

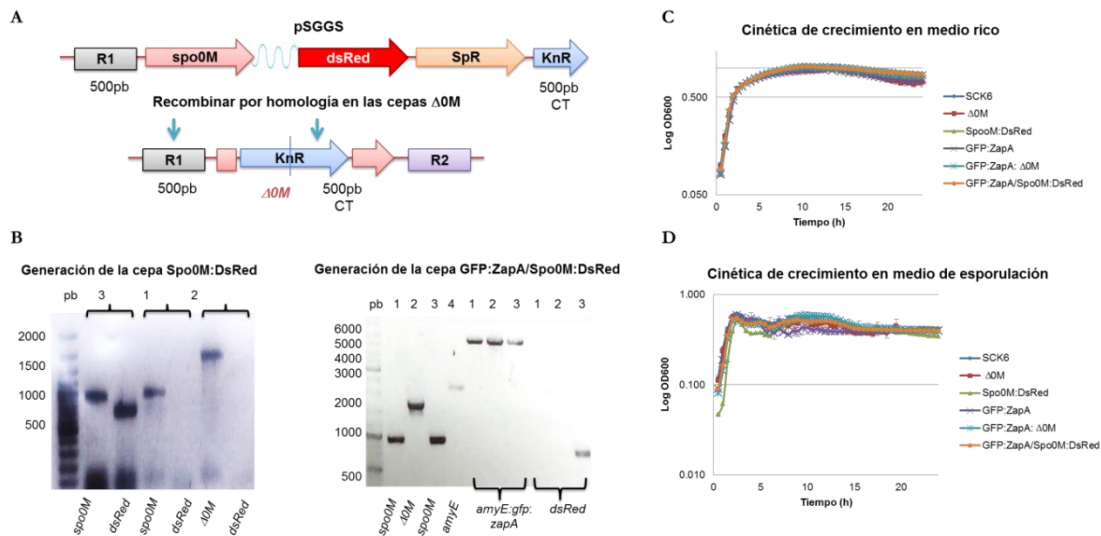


Figura 12. GENERACIÓN DE LAS CEPAS CON LA FUSIÓN FLUORESCENTE Spo0M-DsRed. **A.** Se transformó el vector pSGGS (ver Metodología) en las cepas Δ OM generadas previamente. R1, 500pb río arriba de *spo0M*; SpR, casete de resistencia a espectinomicina, KnR, casete de resistencia a kanamicina; R2, 500pb río arriba de *spo0M*. **B.** Fotografías de geles de agarosa en donde se muestra la amplificación de los genes *spo0M* silvestre, *dsRed*, *spo0M* mutante (Δ OM), *amyE* silvestre y *amyE* mutante (*amyE:gfp:zapA*). Tamaños esperados: *spo0M*, 900pb; *dsRed*, 750pb; Δ OM, 1700pb; *amyE* silvestre, 2100pb; *amyE* mutante, 6000pb. Cepas utilizadas: 1. SCK6/GFP:ZapA, 2. Δ OM/GFP:ZapA: Δ OM, 3. Spo0M:DsRed/GFP:ZapA/Spo0M:DsRed, 4. Bs1A1. **C.** y **D.** Cinéticas de crecimiento en medio rico y medio de esporulación, respectivamente, de las cepas con la fusión Spo0M:DsRed y sus cepas parentales. No existen diferencias significativas en el crecimiento de las cepas en ninguno de los dos medios. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Como se mencionó anteriormente, las cepas Spo0M:DsRed se generaron por recombinación homóloga en las cepas Δ 0M, por lo que se buscó determinar si en las cepas con la fusión estaba restablecido el fenotipo silvestre, lo que indicaría que la funcionalidad de Spo0M también estaba restablecida y que las cepas podrían usarse para analizar la localización de la proteína. El análisis demostró que la fusión fluorescente complementa el fenotipo de las mutantes Δ 0M en los dos fondos genéticos analizados. Mediante el conteo del número total de esporas generadas, se observó que las cepas con la fusión Spo0M:DsRed recuperan los niveles de esporulación que presentan las cepas parentales (Fig. 13A).

Adicionalmente, se analizó la resistencia de estas esporas a calor húmedo y tratamiento químico, y se verificó que recuperan los niveles de resistencia de las cepas con *spo0M* silvestre (Fig. 13B). Finalmente, se observaron preparaciones de ambas cepas al microscopio de campo claro y se observó que el fenotipo filamentoso revierte a un fenotipo normal en las cepas donde la mutante Δ 0M se reemplazó por la fusión fluorescente Spo0M:DsRed (Fig. 13C). El promedio de longitud de las células con *spo0M* silvestre en *spo0M* es de $2.85 \pm 0.95 \mu\text{m}$, y el promedio de longitud de las células de las cepas con la fusión Spo0M:DsRed es de $2.58 \pm 0.94 \mu\text{m}$ (N=249). La distribución de la longitud de las células de la cepa Spo0M:DsRed es similar a la de las células silvestres, y significativamente distinta que la distribución de longitud de las células mutantes (Fig. 13D). Los datos se analizaron mediante un ensayo de comparación múltiple entre cada cepa con un *p value* de 0.001.

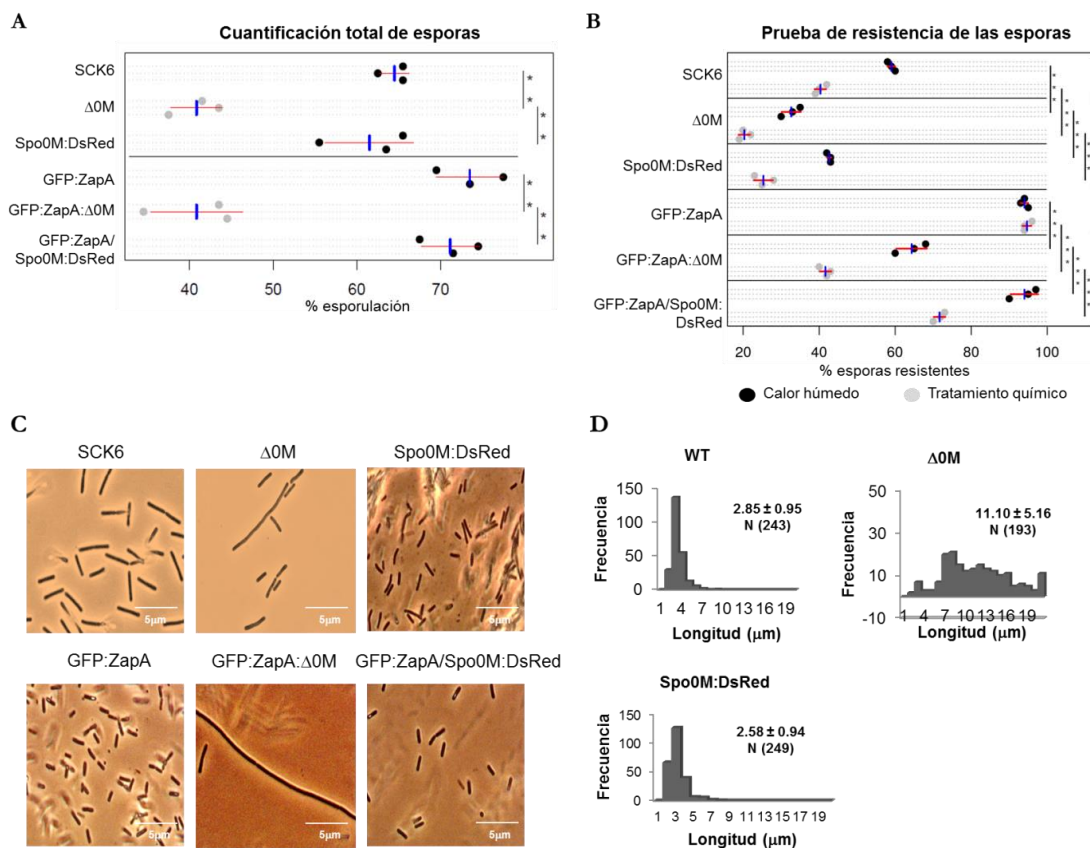


Figura 13. LA FUSIÓN FLUORESCENTE Spo0M:DsRed COMPLEMENTA EL FENOTIPO DE LAS CEPAS MUTANTES Δ 0M. **A.** Se realizó la cuantificación total de las esporas producidas por las cepas silvestre, mutante y con la fusión fluorescente Spo0M:DsRed, y se observó que estas últimas recuperan el porcentaje de esporulación producido por las cepas silvestres en ambos fondos genéticos. **B.** Se analizó la resistencia de las esporas a calor húmedo y tratamiento químico, y se corroboró que las cepas Spo0M:DsRed generan esporas con niveles de resistencia similares a los de las cepas silvestres. Los datos fueron analizados mediante una prueba ANOVA con un *p value* de 0.001; las barras azules representan el valor promedio y las barras rojas la desviación estándar. **C.** Fotografías de microscopía de campo claro, en donde se observa que el fenotipo filamentoso presente en las cepas nulas en *spo0M* se revierte en las cepas Spo0M:DsRed. **D.** Comparación de la distribución de longitudes de las cepas silvestre y mutante en *spo0M* y Spo0M:DsRed. La distribución de longitud de las cepas silvestre y con la fusión fluorescente son muy similares, y significativamente distintas a la distribución de longitud de la cepa mutante. Los datos se analizaron mediante un ensayo de comparación múltiple entre cada cepa con un *p value* de 0.001.

Finalmente, es posible detectar la señal fluorescente al hacer el análisis al microscopio (Fig. 14). Estos resultados nos indican que Spo0M y la proteína fluorescente DsRed son funcionales y permiten realizar el seguimiento de Spo0M en *B. subtilis*. Además, la reversión del fenotipo filamentoso es una confirmación de la participación de Spo0M en la división celular, ya que prueba que al restablecer la función de esta proteína también se restablece la longitud normal de las células.

Para analizar la localización de Spo0M, se eligió la cepa GFP:ZapA/Spo0M:DsRed, debido a la ventaja que brinda tener en la misma cepa el marcador fluorescente del septo. Se obtuvieron cultivos de esta cepa en medio rico durante 6h (Fig. 14A) y medio de esporulación durante 16 h (Fig. 14B), las células se tiñeron con el marcador de DNA, Hoechst, y se observaron en un microscopio TIRF, para luego analizarse mediante microscopía de súper resolución. Como se observa en la figura 14A, Spo0M:DsRed se localiza en un patrón punteado sobre la membrana celular, principalmente cerca de los polos (30.8% de la señal) y en la región media de la célula (36.7% de la señal), donde se esperaría la presencia de un septo, cuando las células se cultivan en medio rico. Cuando las células se cultivan en medio de esporulación (Fig. 14B) es posible observar que Spo0M:DsRed se localiza en las pre-esporas y esporas, y permanece ahí hasta que son liberadas como esporas maduras.

Se realizó un seguimiento de la proteína durante 24 h, para lo cual, la cepa GFP:ZapA/Spo0M:DsRed se cultivó durante este periodo, en medio rico (Fig. 14C) y medio de esporulación (Fig. 14D), y se tomaron muestras cada 2 h. Las células de cada muestra se fijaron y se tiñeron con el marcador de DNA, DAPI, y se obtuvieron fotografías de microscopía confocal de cada tiempo analizado. Se observó que, en ambos medios, la fusión fluorescente puede observarse desde las dos horas de cultivo, en donde aparece dispersa en la célula, y a partir de las 4 h se localiza en el patrón punteado

previamente mencionado, en medio rico, mientras que se dirige hacia las esporas, en medio de esporulación.

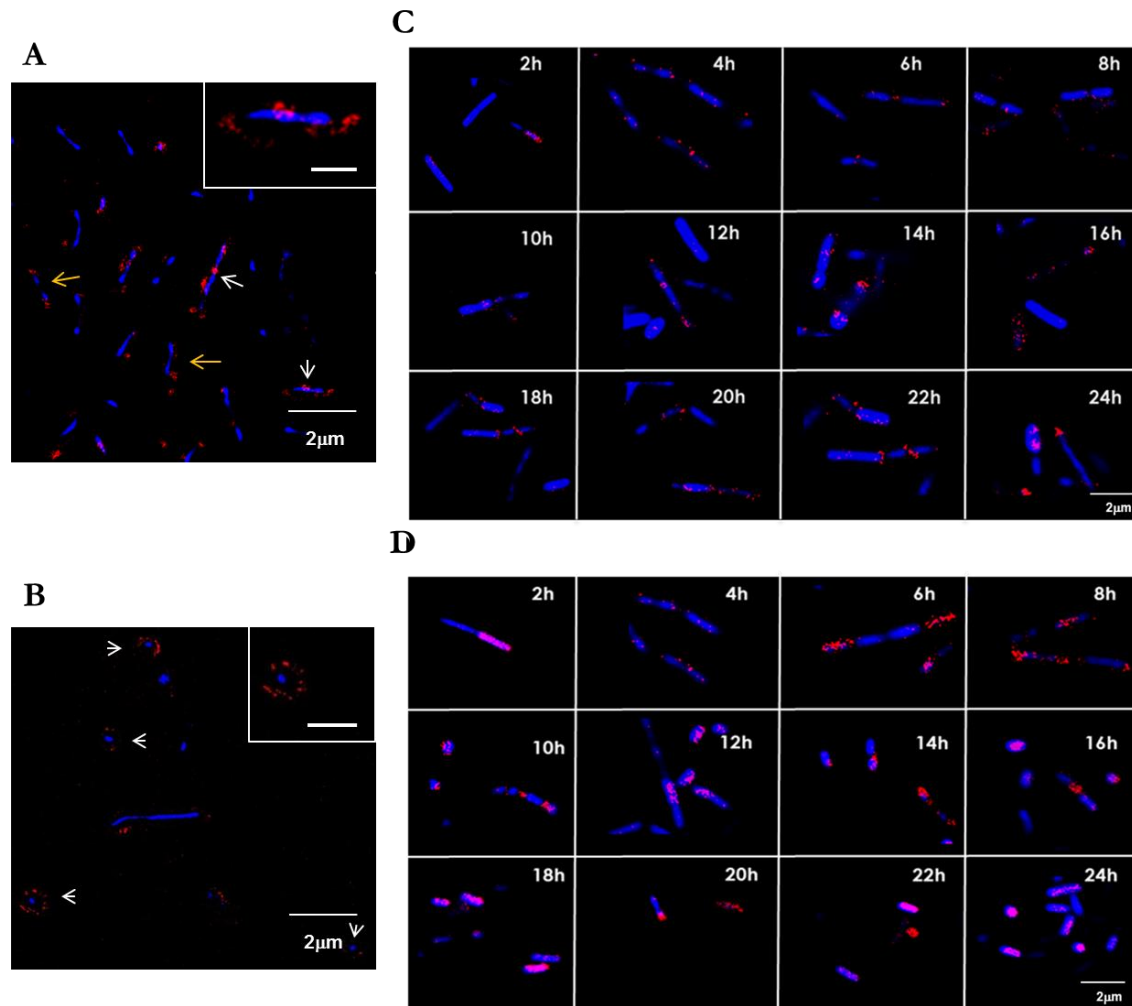


Figura 14. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE Spo0M:DsRed. La cepa GFP:ZapA/Spo0M:DsRed se cultivó en medio rico (**A.** y **C.**) y medio de esporulación (**B.** y **D.**). En medio rico, la proteína se localiza en un patrón punteado en los polos (flechas naranjas) y la región media de la célula (flecha blanca), mientras que en medio de esporulación la proteína se localiza en las pre-esporas y se mantiene hasta que se liberan como esporas maduras (cabeza de flecha).

Estos resultados confirman que la localización de Spo0M podría estar relacionada con su función y depende del estadio de vida de la bacteria (Fig. 15). Durante la etapa de crecimiento vegetativo, la localización en los polos y la región del septo podrían estar relacionadas con la participación de la proteína en la división celular. Se sabe que las proteínas que constituyen el divisoma se reclutan hacia el sitio de división en etapas tempranas, por otros elementos regulatorios, como FtsA, y se mantienen hasta que el proceso se completa (11). Otro ejemplo lo constituyen los reguladores espaciales del

posicionamiento del septo, MinCD y DivIVA, que se localizan durante el crecimiento de la bacteria en los polos celulares y son movilizados hacia la región del septo durante la división (16, 64), su función es asegurar que el septo se forme únicamente en la región media de la célula y evitar que se formen septos adicionales antes que se complete el proceso ya iniciado. Durante la esporulación, Spo0M se redirige hacia las esporas, por lo que nuestra propuesta de que esta proteína podría estar involucradas en etapas posteriores del proceso de diferenciación podría estar también relacionada con su distribución. Los resultados también confirman nuestra hipótesis de que la función de Spo0M no sólo está restringida al proceso de esporulación, sino que está relacionada al proceso de división celular, dada la localización de la proteína y su presencia durante la fase de vida vegetativa de *B. subtilis*.

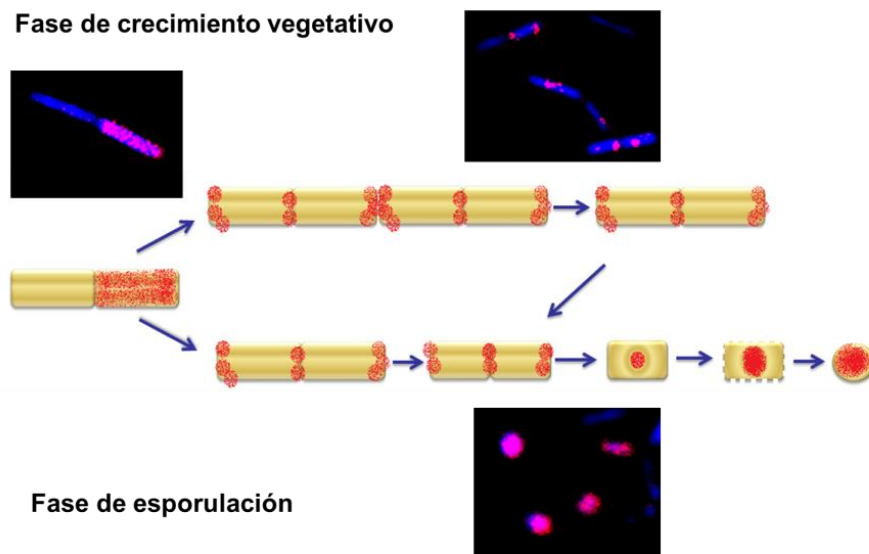


Figura 15. DIAGRAMA QUE MUESTRA LA DISTRIBUCIÓN DE Spo0M DURANTE LOS ESTADIOS DE DESARROLLO DE *B. subtilis*. Durante la fase vegetativa Spo0M se localiza en los polos celulares y en la región media de la célula. Una vez que la célula entra en el proceso de esporulación Spo0M se dirige y se concentra en la pre-espora, y se mantiene en esta estructura hasta que es liberada como una espora madura.

El análisis de la localización de Spo0M mostró que es posible detectar la señal de la fusión fluorescente desde etapas tan tempranas del crecimiento como 2 h de cultivo, tanto en medio rico como en medio de esporulación. Para determinar si esta señal corresponde efectivamente a la fusión Spo0M:DsRed se analizó la expresión de esta proteína mediante WB. Nuevamente, la cepa GFP:ZapA/Spo0M:DsRed se cultivó en medio rico y en medio de esporulación durante 24 h, se tomaron muestras del cultivo cada 2 h y se extrajo la proteína total de cada muestra. La proteína se cuantificó y se utilizaron 30 µg de proteína total de cada muestra para el análisis. Para la detección se utilizó un anticuerpo comercial anti

DsRed. El peso reportado para Spo0M es de 28-29 kDa (31), y el peso de la proteína reportera DsRed es de 28 kDa, por lo que el peso esperado para la proteína de fusión es de 56 kDa, aproximadamente.

Los resultados mostraron que, en medio rico, la proteína de fusión puede detectarse desde las 2 h del cultivo, su expresión se incrementa y alcanza un nivel estable hacia las 10 h, y a partir de entonces, puede detectarse en niveles similares hasta las 22 h (Fig. 16A). En medio de esporulación los resultados son muy similares, la proteína se detecta desde las 2 h, alcanza un nivel estable hacia las 8 - 10 h y se detecta hasta las 22 h (Fig. 16B).

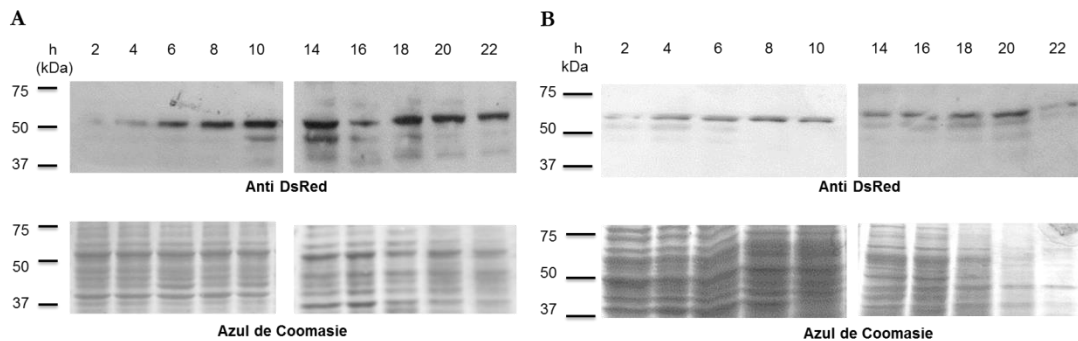


Figura 16. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE Spo0M:DsRed MEDIANTE WESTERN BLOT. La cepa GFP:ZapA/Spo0M:DsRed se cultivó en medio rico (A.) y en medio de esporulación (B.) durante 24 h, se tomaron muestras del cultivo cada 2 h y se extrajo la proteína total de cada muestra. Se analizaron 30 μ g de proteína total en cada tiempo y la proteína de fusión se detectó utilizando un anticuerpo comercial anti DsRed. En ambos casos, Spo0M:DsRed puede detectarse desde las 2 h de cultivo, incrementa su expresión y se estabiliza hacia las 10 h. Permanece así hasta las 22h. Se muestra el gel teñido con azul de Coomassie como control de carga.

Existe poca información acerca de la regulación que existe sobre la expresión Spo0M; inicialmente se reportó que está bajo la regulación del factor sigma de fase estacionaria σ^H (31). Se sabe que σ^H se expresa desde la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, sin embargo su expresión y estabilidad aumentan en la transición entre la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria, lo que estimula la transcripción de genes involucrados en las etapas tempranas del proceso de esporulación (65). A pesar de que la concentración de σ^H no es muy alta durante la fase de crecimiento exponencial, es suficiente para que regule la expresión de genes esenciales en esta etapa de vida de la bacteria, como la fumarasa CitG (actuando sobre su promotor P2) o la proteína constitutiva del divisoma FtsA (actuando de igual manera sobre su promotor P2), cuya actividad es necesaria durante toda la vida de la bacteria tanto para la división como para la esporulación (66–68). La regulación de las proteínas que tienen funciones a lo largo de toda la vida de la bacteria puede estar a cargo de más de un factor sigma, como en el caso de FtsA, cuya expresión depende de 3 promotores y de la actividad tanto de σ^A como de σ^H

(66). En el caso de *Spo0M*, adicionalmente se ha reportado que está regulado por el factor sigma de estrés σ^w (5, 34, 35, 69, 70), que es un factor extra citoplásmico que le permite a la bacteria resistir condiciones externas adversas, como alta osmolaridad o cambios de pH (69, 70).

La regulación de *spo0M* por σ^w podría proveer a la célula de una regulación externa para el inicio del proceso de esporulación, mientras que la regulación por σ^H podría estar a cargo de la expresión de la proteína tanto en la fase de crecimiento exponencial como en la fase estacionaria, y regular así sus funciones en estas dos etapas del crecimiento de la bacteria. Sin embargo, considerando la baja concentración de σ^H durante la fase vegetativa, se decidió determinar, por métodos bioinformáticos, si la región regulatoria de *spo0M* podría contener un sitio potencial de unión para el regulador de la fase de crecimiento exponencial σ^A , que es el principal factor sigma activo durante la fase de crecimiento vegetativo de *B. subtilis* (71). Utilizando un enfoque filogenético de footprinting, se obtuvo las secuencias del gen *spo0M* de organismos del género *Bacillus* de la base de datos de operones ProOpDB (72). Las secuencias correspondientes a las regiones intergénicas 5' de estos genes se obtuvieron del servidor web GeCont (73). Estas secuencias se usaron para realizar una búsqueda de los potenciales sitios de unión del factor sigma constitutivo σ^A usando el logaritmo de Mulligan y col. (74). Los resultados se representaron mediante un logo, generado utilizando el servidor comercial WebLogo (75), y se muestran en la figura 17.

De acuerdo a estos resultados, la secuencia consenso de los genes *spo0M* del género *Bacillus*, contiene en su región 5' un potencial sitio de unión para el factor σ^A correspondiente a la secuencia 5' -TTGACA-17 nt-TATAAT-3'. (76). Este fenómeno de regulación no es nuevo, y se ha observado previamente en proteínas del metabolismo y división celular, anteriormente mencionadas, e incluso en proteínas involucradas en la esporulación, como SpoVG. Esta proteína contiene dos regiones regulatorias sobrelapadas, una correspondiente a σ^H y la otra al represor AbrB (77); la ausencia de *spoVG* en *B. subtilis* ha sido relacionada con defectos en la división celular, en el establecimiento del septo, en el inicio de la esporulación y en la formación de esporas resistentes al calor (78–80), un fenotipo muy similar al observado en las mutantes $\Delta 0M$.

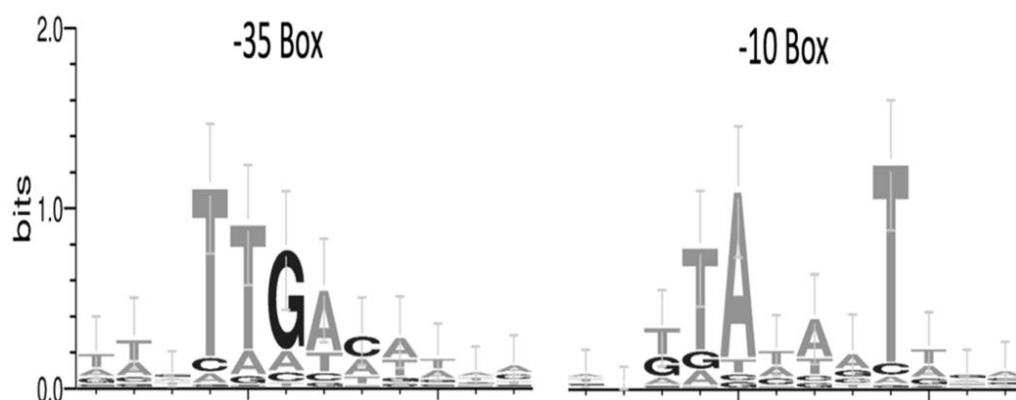


Figura 17. IDENTIFICACIÓN DE UN POSIBLE SITIO DE UNIÓN DEL FACTOR SigmaA A LA REGIÓN PROMOTORA DE *spo0M*. Se realizó una búsqueda de un potencial sitio de unión del factor de fase vegetativa σ^A a la región 5' de una secuencia consenso de los genes *spo0M* presentes en bacterias del género *Bacillus*. La secuencia encontrada se representa como un logo.

DETERMINACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE INTERACCIÓN DE Spo0M EN *B. subtilis*

La determinación de los elementos con los que interactúa una proteína dentro de una célula puede revelarnos información acerca de su función, sobre todo en el contexto de proteínas cuya caracterización aún no está completa. Para la identificación de los interactores de Spo0M en *B. subtilis* se generó la construcción Spo0M-FLAG, en el vector comercial pT7-MAT-FLAG, que contiene la etiqueta FLAG y un promotor inducible por IPTG (ver Metodología). Se eligió la etiqueta FLAG, debido a que ofrece las ventajas de ser pequeña, puede ser reconocida de manera muy específica por anticuerpos, cuenta con una secuencia de corte para la enterocinasa (puede ser removido) y localizarse frecuentemente en la superficie de las proteínas a las que se fusiona debido a su hidrofiliidad (81, 82). Además, se sabe que puede facilitar el plegamiento de algunas proteínas a las que se ha fusionado (83). La estrategia que se siguió fue la amplificación de la secuencia de *spo0M* con sitios de corte presentes en la región de multiclonación del vector (Fig. 18A). La generación de esta construcción se realizó en la cepa DH5- α de *Escherichia coli*, se verificó por digestión enzimática, secuenciación y PCR (Fig. 18B y 18C) y se transformó en la cepa BL21 de *E. coli* para la posterior inducción de la expresión heteróloga de la proteína. La cepa con la construcción verificada se cultivó en medio rico hasta la etapa de crecimiento exponencial (OD600 0.6 – 0.8) y la expresión de la fusión Spo0M-FLAG se indujo con 0.5mM de IPTG (Fig. 18D).

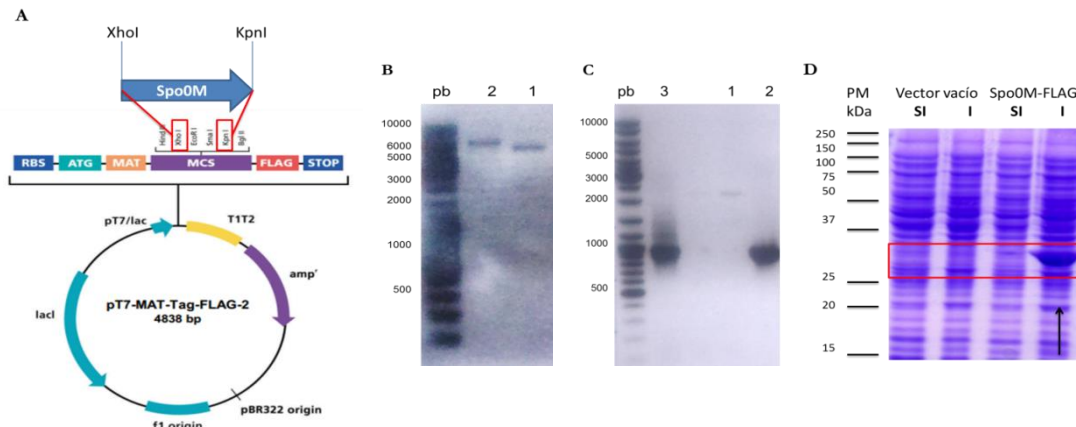


Figura 18. GENERACIÓN DE LA FUSIÓN Spo0M-FLAG. **A.** Se generó una fusión del gen *spo0M* con el marcador FLAG, utilizando el vector comercial T7-MAT-FLAG, insertando el fragmento amplificado del gen, con sitios de corte para enzimas de restricción específicas en el sitio de multiclonación del vector. **B.** La integración de *spo0M* en el vector se verificó mediante restricción enzimática, con una enzima que lineariza el plásmido receptor. Se muestra la construcción con el vector vacío (1) de aproximadamente 5000pb y la construcción con *spo0M* (2) de aproximadamente 6000pb. **C.** La integración también se verificó amplificando un PCR del fragmento de *spo0M* (900pb), usando como templado el vector vacío (1), el vector Spo0M-FLAG (2) y DNA genómico de la cepa Bs1A1 (3), como control. **D.** Fotografía de un gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie, en donde se muestra la inducción de la expresión de Spo0M-FLAG con 0.5mM de IPTG (flecha), y se compara con muestras del vector vacío sin inducir (SI) e inducido (I), y de la cepa con la construcción Spo0M-FLAG sin inducir. Spo0M-FLAG tiene un peso aproximado de 30 kDa (rectángulo).

Para la determinación de los elementos de interacción se partió de un cultivo de 50mL de la cepa Spo0M-FLAG en medio rico, se llevó a la fase exponencial de crecimiento (OD_{600} 0.6 – 0.8) y se indujo la expresión de la fusión con 0.5mM de IPTG. Se eliminó el medio al cultivo y se extrajo la proteína total (ver Metodología). Se identificaron bandas diferenciales que estuvieran presentes en las muestras problema, con respecto a la muestra control. Se obtuvieron 3 réplicas biológicas de este experimento y se identificaron 7 bandas diferenciales (Fig. 19), en cada réplica, que se escindieron del gel y se enviaron a secuenciar por espectrometría de masas.

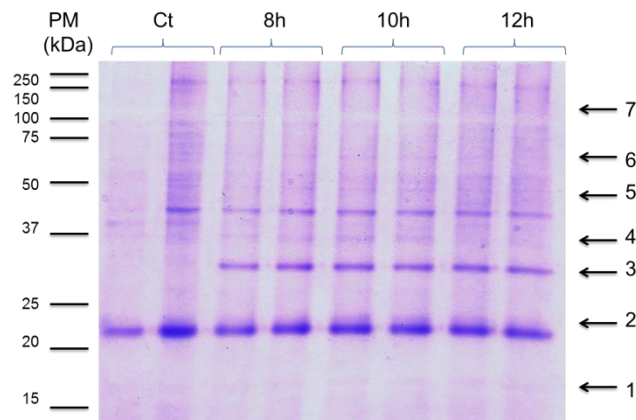


Figura 19. IDENTIFICACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE INTERACCIÓN DE Spo0M EN *B. subtilis*. Fotografía de un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, en donde se muestra la identificación de las 7 bandas diferenciales de las muestras problema (flechas), con respecto a la muestra control, que se contienen los elementos de interacción de la fusión Spo0M-FLAG con el extracto total de proteínas de *B. subtilis*, y que se enviaron para su análisis por espectrometría de masas.

Los resultados arrojados por el análisis de espectrometría de masas se analizaron utilizando el programa Scaffold 4.4.7 (60), de uso comercial (Proteome Software Inc. Portland, OR). El análisis crudo identificó cerca de 800 proteínas distintas; ajustando los parámetros del porcentaje de cobertura en la identificación de la proteína, porcentaje de confianza de que la proteína esté correctamente identificada y la representación total en el espectro, se obtuvieron los resultados más representativos. Después de los filtros aplicados, se identificaron y seleccionaron para su posterior análisis 35 proteínas de interacción con Spo0M. En la figura 20 y la tabla 3 se resumen estos resultados, agrupando las proteínas identificadas de acuerdo a su función.

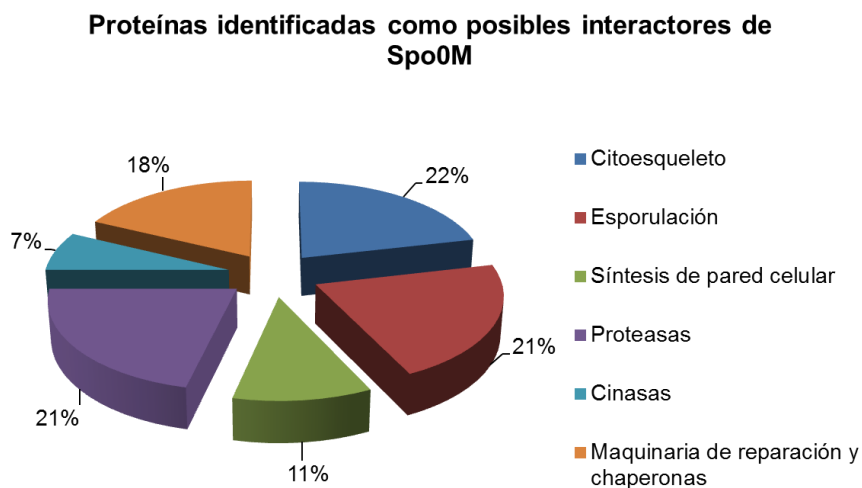


Figura 20. GRÁFICO QUE RESUME LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LOS ELEMENTOS DE INTERACCIÓN DE Spo0M EN *B. subtilis*. Se muestran las proteínas identificadas, después de un filtrado de los datos, agrupadas por su función.

TABLA 3. POSIBLES ELEMENTOS DE INTERACCIÓN DE Spo0M

Nombre	Función
<i>Citoesqueleto y remodelación de membranas</i>	
FtsZ	Homólogo de la tubulina eucariota, principal componente del septo. Necesario para la división celular y la esporulación (11, 84).

DivIVA	Evita la formación del septo en sitios donde se localiza el cromosoma; se posiciona en los sitios de división celular en etapas tempranas, y forma anillos estables que se mantienen cerca del septo hasta el final de la citocinesis. Se localiza en los polos celulares mientras no haya división (85, 86).
EzrA	Regulador negativo de la polimerización de FtsZ, evita su localización en sitios inespecíficos. Mutantes nulas son filamentosas o con defectos en la localización son filamentosas (23).
FtsA	Miembro de la familia MreB, probablemente necesario para la estabilización del anillo de FtsZ y el reclutamiento de otras proteínas del divisoma (18, 19)
MreB	Homólogo de la actina eucariota, esencial para el mantenimiento de la forma celular, dirige la síntesis de pared celular (87–89).
SepF	Ancla FtsZ a la membrana plasmática durante la división celular (21).
FloA	Homólogo de la flotilina eucariota, involucrada en la organización de las balsas lipídicas (90). Una mutación nula en <i>floA</i> afecta la esporulación (91), la formación de biopelícula, competencia y morfología celular (92, 93).
FtsE	Transportador ABC que forma parte del sistema de dos componentes FtsEX, necesario para la elongación de la pared celular y la fosforilación de Spo0A (94).
<i>Esporulación</i>	
CotE	Requerida para en ensamble del abrigo (95).
SpoIIAC	Presente en la célula madre, necesaria para la degradación de la pared celular después de la formación del septo y antes del engullimiento (96).
SpoIIIAH	Parte de la región transmembranal que une a la célula madre a la pre-espora, necesaria para la expresión de SigmaG y el ensamble del abrigo (97).
YdcC	Una mutante nula muestra defectos en la esporulación y en la expresión de SigmaG. Probablemente involucrada en el engullimiento (98).
Factor A asociado a SpoIVD	Probablemente involucrada en el ensamble del abrigo, la resistencia a la lisozima y la germinación (99).

GerM	Hidrólisis del córtex durante la germinación (100, 101).
GerKA	Receptor de azúcares, aspartato y KCl durante la germinación (101).
GerQ	Necesario para la germinación (102).
Spo0A	Regulador maestro de la esporulación, su fosforilación determina el inicio de este proceso (3, 6).
CotF	Involucrada en la resistencia de las esporas (97, 102).
SpoVR	Involucrada en la síntesis del córtex (103).
<i>Síntesis de pared celular</i>	
PBP3	Síntesis de pared celular, probablemente involucrada en la elongación de la célula (104).
PBP1	Síntesis de la pared celular durante la división (25, 105).
PBP4	Síntesis de la pared celular, probablemente involucrada en la elongación de la célula (106).
<i>Proteasas</i>	
ClpC	Subunidad ATPasa de una proteasa de serina dependiente de ATP (107).
ClpP	Subunidad proteolítica de una proteasa dependiente de ATP; regula el control de calidad en procesos como competencia, esporulación y motilidad (108).
ClpY	Subunidad ATPasa de una proteasa de serina dependiente de ATP (107).
ClpQ	Proteasa dependiente de ATP perteneciente al sistema de dos componentes ClpQ/ClpY (107).
FtsH	Metaloproteasa dependiente de ATP involucrada en la división celular, la esporulación y la formación de biopelícula. Degrada a la fosfatasa Spo0E y a las fosfatasa Rap. Degrada <i>in vitro</i> a Spo0M (32, 33, 109).
PepF	Oligoendopeptidasa involucrada en el recambio de proteínas de la célula. Su sobreexpresión causa retraso en la esporulación y disminución de la competencia (110).
<i>Cinasas</i>	
HPrK	Cinasa y fosfatasa de serina involucrada en la represión de catabolitos (111).
RsbW	Cinasa de serina que regula la transcripción dependiente de sigma B (112).

<i>Maquinaria de reparación/ chaperonas</i>	
GroEL	Chaperonina perteneciente a la familia HSP60, inducida por choque térmico; co-represora de HrcA. La falta de GroEL en <i>E. coli</i> genera células filamentosas (113, 114).
DnaK	Proteína de choque térmico de clase I, funciona con péptidos nacientes. Su desregulación en <i>E. coli</i> causa filamentación y deslocalización de FtsZ (115, 116).
Trigger factor (tig)	Chaperona que interactúa con los péptidos recién sintetizados; la falta de tig en <i>E. coli</i> genera filamentación. La falta de tig en <i>B. subtilis</i> causa un retraso en la germinación de las esporas (117–119).
HtpG	Proteína de choque térmico clase III (120).
PrsA	Chaperona molecular necesaria en la translocación de proteínas de exportación. Necesaria para el plegamiento de las PBP's (104, 121).

El primer grupo de proteínas que fue identificado fue el de la maquinaria de reparación y chaperonas, entre las que se encuentran las chaperonas GroEL, DnaK, trigger factor, HtpG y maquinaria de reparación de DNA. Estos elementos se activan en respuesta a estrés, o a un plegamiento inadecuado de las proteínas, como un sistema de control de calidad, y permiten que estas proteínas de plieguen de manera adecuada, o se degraden, dependiendo de la gravedad del daño. Se ha reportado que mutantes en las tres primeras chaperonas mencionadas, generan un defecto de división celular en *E. coli*, e induciendo filamentación (118). Sin embargo, hasta ahora no está reportado cuál o cuáles pueden ser los interactores de estas chaperonas que podrían estar afectando la división celular en las mutantes; en el caso de trigger factor, se sabe que el fenotipo es reversible por la sobreexpresión de FtsZ (13), mientras que en el caso de DnaK, está reportado que la desregulación de esta proteína provoca defectos en la localización de la misma FtsZ (122).

A continuación, encontramos al grupo de las cinasas, en donde se encuentran la cinasa HPrK, serin cinasas, glicerol cinasas, y ribocinasas, entre otras. El siguiente grupo, con 3% del total de las proteínas identificadas, fue el grupo de las proteasas. Entre ellas se identificó a la metaloproteasa FtsH que, como se mencionó previamente, degrada y regula la concentración de Spo0M, probablemente para mantener a esta proteína en las concentraciones necesarias para que la esporulación ocurra de manera adecuada (32). El hallazgo de esta proteína puede considerarse como un control experimental, ya que es el único interactor ya reportado de Spo0M. Además de FtsH, se reportan las proteasas ClpY y ClpQ, que forman parte de un sistema de dos componentes, en el cual ClpY reconoce a los sustratos y ClpQ

es la peptidasa que los degrada (123), sin embargo, la funcionalidad *in vivo* es poco conocida. Finalmente, otra peptidasa que vale la pena mencionar, es la oligoendopeptidasa F (PepF), que es una enzima capaz de degradar oligopéptidos, pero no proteínas completas, y se cree que está involucrada en el recambio normal de proteínas en la bacteria (110). Kanamaru y col., han reportado que la sobreexpresión de PepF provoca una inhibición en el inicio de la esporulación y una disminución de la competencia, esto al degradar los péptidos PhrA y PhrC, provocando una desregulación de las fosfatasa RapA y RapC, respectivamente, que defosforilan a Spo0A (inhibición de la esporulación) y ComA (inhibición de la competencia (110)). Las chaperonas, cinasas y fosfatasa pueden ser consideradas como elementos promiscuos de las redes de interacción, sin embargo, es notable que entre las proteínas reportadas se encuentren proteínas que de alguna u otra forma se involucran en la esporulación o la división celular.

Por motivos de interés de este trabajo, nos centramos en 3 grupos de proteínas que podrían explicar los defectos en la morfología de la mutante en *spo0M*, estos son: esporulación, citoesqueleto y organización de membrana y síntesis de pared celular.

En cuanto a las proteínas involucradas en la esporulación, la mayoría están involucradas en etapas tardías del proceso, como la formación del córtex, del abrigo, la germinación o incluso la resistencia de las esporas. Parecería poco probable encontrar a estas proteínas en las etapas de cultivo en que se tomaron las muestras de los lisados totales de *B. subtilis*, sin embargo, la mayoría están bajo la regulación de factores sigma que aparecen más temprano en el proceso de esporulación, y su expresión parece iniciar antes de que sean requeridos, en etapas iniciales del proceso. Además, los resultados arrojan una posible interacción con el regulador maestro de la esporulación Spo0A. De acuerdo a la bibliografía, la expresión de Spo0A disminuye en ausencia de Spo0M (31), por lo que la interacción con esta proteína podría ser posible, aunque tal vez no de manera directa, sino a través de un complejo de interacción de varias proteínas. Spo0M no sería el primer ejemplo de una proteína involucrada en más de un estadio del proceso de esporulación; ejemplos remarcables de esto son SpoIIE y SpoIIIE. SpoIIE es una fosfatasa necesaria para el posicionamiento polar del septo durante la esporulación, donde interactúa con FtsZ y permite su relocalización de medial a polar (28); una vez que el septo se ha establecido, se relocaliza en la cara interna de la membrana de la pre-espora, donde libera al factor σ^F de la interacción inhibitoria con SpoIIAB (8). Por otro lado, SpoIIIE es una traslocasa, que participa en la segregación de los cromosomas y la recombinación homóloga en algunos eventos de la vida vegetativa de la bacteria (124). Durante la esporulación, SpoIIIE trasloca los tres tercios del cromosoma que quedan en la célula

madre hacia la pre-espora, después del establecimiento del septo (29); finalmente, se le ha relacionado con la fusión de membranas durante el engullimiento (125). De corroborarse su función en etapas más avanzadas de la esporulación, Spo0M entraría a formar parte de este grupo de proteínas multifuncionales.

Las proteínas de síntesis de la pared celular llamaron nuestra atención, debido a que se sabe que estas proteínas, junto con el homólogo de la actina eucariota, MreB, pueden estar involucradas en la elongación de las células durante el crecimiento (24, 89, 105), y como ya se sabe, la mutante en *spo0M* presenta el fenotipo de células alargadas que podría relacionarse con defectos en la síntesis de la pared celular, al igual que las alteraciones morfológicas observadas en la membrana plasmática. Adicionalmente, encontramos a la proteína FloA, como parte de las proteínas del citoesqueleto y organización de membrana. Esta proteína es un homólogo de la flotilina eucariota, que se encarga de organizar las balsas lipídicas bacterianas, y por lo tanto, permite la correcta funcionalidad de diversas proteínas que se localizan en estas estructuras. La ausencia de *floA* se relaciona con defectos en la morfología celular, disminución en la formación de biopelícula, competencia y esporulación (90, 92, 93). La desorganización de los dominios funcionales de membrana provoca un fenotipo pleiotrópico que se asemeja al observado en la mutante de *spo0M*.

Finalmente, los resultados más interesantes para nosotros fueron los encontrados con las proteínas del citoesqueleto. Aquí, encontramos a FtsZ, que es el elemento constitutivo del anillo Z, y forma parte estructural del divisoma, un complejo proteico que se ensambla alrededor de esta estructura, para permitir la estabilización de este anillo y asegurar la división celular (12). En este complejo proteico participan reguladores negativos y positivos de FtsZ, entre los que se encuentran ZapA, FtsA, EzrA, SepF, PBP1 y PBP2, entre otras proteínas (11, 12, 18); varios de estos elementos aparecieron en nuestro análisis y nos permiten sugerir que Spo0M podría interactuar con este complejo y participar en la división celular, como indican nuestros resultados previos.

Se seleccionaron las proteínas del citoesqueleto para un estudio más a fondo. Se analizó la interacción de Spo0M con proteínas involucradas en la división celular, FtsZ y ZapA, mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. ZapA es un elemento regulador positivo de la polimerización del anillo Z y se sabe que estabiliza y une esta estructura a la membrana plasmática en el sitio de división (20). Esta proteína no fue identificada directamente en el análisis de los interactores, probablemente debido a su tamaño pequeño (9kDa), sin embargo, la determinación de una interacción con Spo0M corroboraría la

interacción de esta proteína con un complejo molecular involucrado en la división celular. Además, contamos con la cepa reportera GFP:ZapA, en donde la expresión de esta fusión fluorescente puede inducirse con xilosa y puede identificarse en un extracto de proteínas con un anticuerpo comercial anti GFP. El experimento se realizó utilizando proteína intrínseca y proteína de producción heteróloga. En el experimento con proteína intrínseca, se obtuvieron extractos totales de proteína de las cepas Spo0:DsRed o GFP:ZapA/Spo0M:DsRed inducida con 0.1% de xilosa. Se permitió la interacción de 1 µg total de proteína de cada una de las cepas con una dilución 1:1000 de anticuerpo anti-DsRed durante 3h a 4°C. Después de este tiempo, la mezcla se incubó con 20 µL de perlas de proteína A sefarosa durante 3h a 4°C. Las perlas se lavaron 3 veces con buffer de lisis. Como control se utilizó 1 µg del extracto total de proteína mencionado, incubado con un anticuerpo inespecífico y con perlas de proteína A sefarosa. Las que permanecieron en las perlas tratadas se hicieron migrar en un SDS-PAGE. Se analizaron en el mismo gel muestras control del lisado total de proteínas de la cepa de *B. subtilis* utilizadas. La presencia de FtsZ o GFP-ZapA fue determinada mediante WB utilizando anticuerpos anti-FtsZ o anti-GFP. Los resultados muestran que FtsZ está presente e inmunoprecipita en el mismo complejo molecular en donde se encuentra Spo0M:DsRed (Fig. 21A) y lo mismo ocurre con la fusión de GFP:ZapA, que también co-inmunoprecipita con Spo0M:DsRed (Fig. 21B). Esto no ocurre con la muestra control en donde se empleó un anticuerpo inespecífico.

Para el experimento con proteína de producción heteróloga, se obtuvo un extracto total de la cepa Spo0M-FLAG inducida y se permitió la unión de 1 µg total de proteína con las perlas de agarosa acopladas al anticuerpo anti-FLAG, como se mencionó anteriormente. Se obtuvo además un extracto total de proteínas de la cepa silvestre Bs1A1 o GFP:ZapA inducido, de cultivos en etapa de crecimiento exponencial (OD_{600} 0.6 – 1) y se permitió la interacción con el complejo perlas-Spo0M-FLAG, durante 3 h a 4 ° C. La columna se lavó para eliminar las proteínas no unidas. Como control, se utilizó el extracto total de una cepa que contenía el vector pT7-MAT-FLAG vacío, al igual que en el experimento anterior. Las perlas tratadas y control se resuspendieron en 15 µL de buffer de carga 4X, se hirvieron durante 5 minutos y se corrieron en un SDS-PAGE, además, se analizaron en el mismo gel muestras control del lisado total de proteínas de la cepa de *E. coli* Spo0M-FLAG y de la cepa Bs1A1 de *B. subtilis*. La interacción de Spo0M se analizó mediante WB utilizando anticuerpos anti FtsZ o anti GFP comerciales. Los resultados mostraron que Spo0M interactúa con ambas proteínas (Fig. 21C y 21D) y no así con la muestra correspondiente al vector vacío. Este resultado indica Spo0M está interaccionando con un complejo molecular en donde están presentes FtsZ y ZapA, y nos permite sugerir que es este complejo el que permite la intervención de Spo0M en el proceso de división celular.

Finalmente, se evaluó la colocalización de las proteínas Spo0M:DsRed y GFP:ZapA mediante microscopía de súper resolución. Para ello, se realizó un cultivo de la cepa GFP:ZapA/Spo0M:DsRed en medio rico y se llevó hasta la etapa de crecimiento exponencial (OD_{600} 0.6 – 0.8). La expresión de la fusión GFP:ZapA se indujo con 0.1% de xilosa, y se incubó durante 8 h más a 37 ° C. Después de este tiempo las células se fijaron y se tiñeron con el marcador de DNA, Hoechst. Se observó que existe un colocalización entre la señal de estas dos proteínas (Fig. 21E), que se evalúa por la mezcla de los canales rojo y verde que genera una señal amarilla después del procesamiento de las imágenes. Estos resultados sugieren que Spo0M interactúa con elementos de la división celular y confirman nuestra hipótesis de que Spo0M está involucrada en la etapa de vida vegetativa de *B. subtilis* y su función no está restringida a la fase de esporulación de la bacteria.

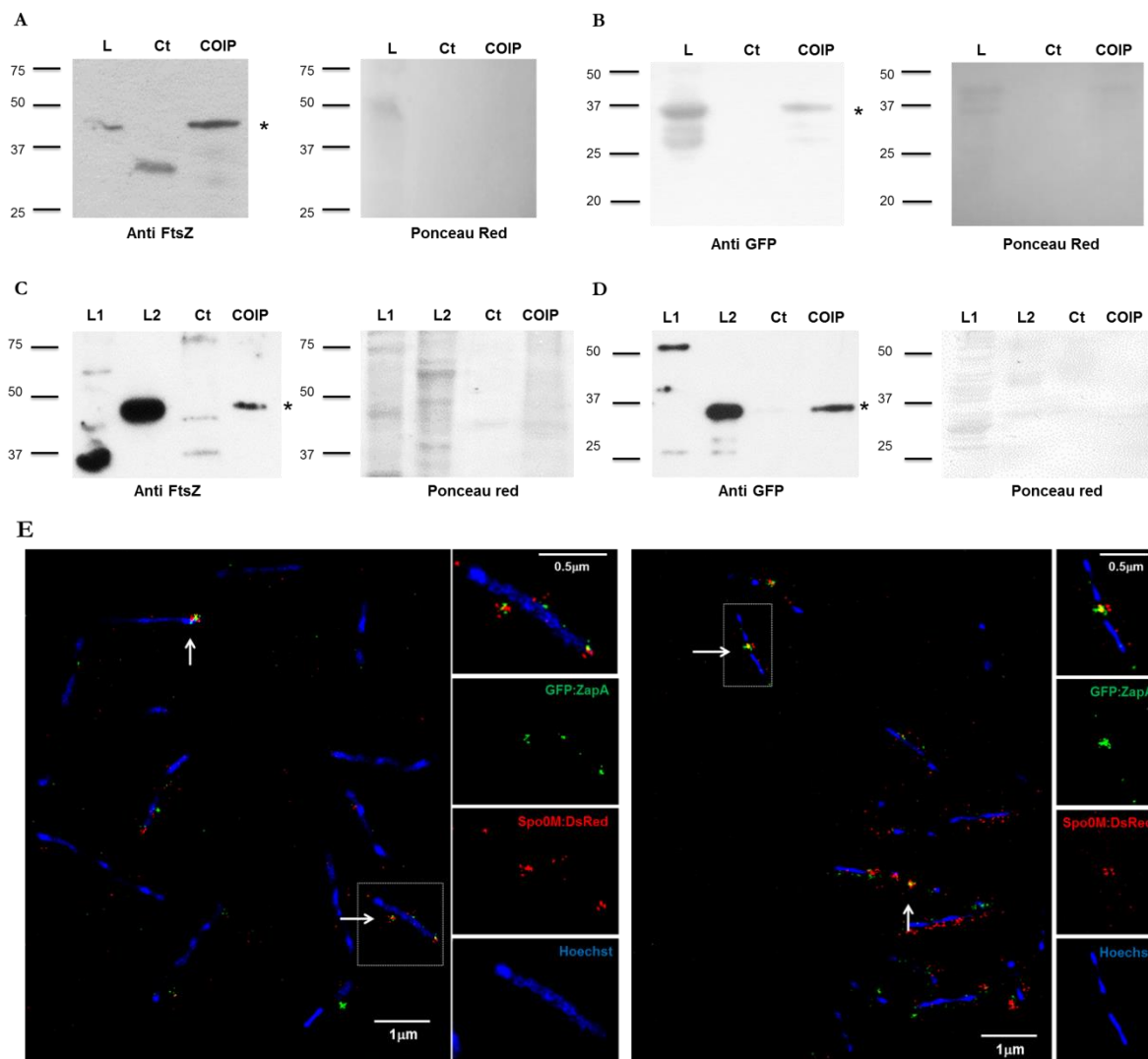


Figura 21. Spo0M INTERACTÚA CON PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA DIVISIÓN CELULAR. Se evaluó la interacción de Spo0M-FLAG con las proteínas FtsZ (**A** y **C**) y ZapA (**B** y **D**). El experimento se realizó utilizando proteína intrínseca (**A** y **B**) y de producción heteróloga (**C** y **D**) y la interacción se reveló mediante WB utilizando anticuerpos comerciales anti FtsZ o anti GFP. L. Lisado total de proteínas de la cepa empleada de *B. subtilis*. L1. Lisado total de proteínas de la cepa Spo0M-FLAG. L2. Lisado total de proteínas de la cepa empleada de *B. subtilis*. **E.** Fotografías de microscopía de súper resolución en donde se muestra una señal de colocalización entre GFP:ZapA y Spo0M:DsRed (flecha). La cepa GFP:ZapA/Spo0M:DsRed se cultivó en medio rico hasta la etapa de crecimiento exponencial, la expresión de GFP:ZapA se indujo con 0.1% de xilosa y se incubó a 37 ° C durante 8 h. Las células se tiñeron con el marcador de DNA, Hoechst. Spo0M:DsRed y GFP:ZapA colocalizan en la región media de la célula y en los polos celulares (flechas blancas).

IDENTIFICACIÓN DE HOMÓLOGOS DE Spo0M EN DIFERENTES GÉNEROS BACTERIANOS Y DE ARQUEAS

Las proteínas involucradas en la formación del septo y la división celular de *B. subtilis* tienen homólogos estructurales y funcionales en diversos géneros bacterianos; esto se explica dada su relevancia en un proceso fundamental de la bacteria, que presenta ciertos elementos regulatorios conservados entre diferentes organismos (11, 126, 127). Se realizó una búsqueda para identificar a los homólogos de la proteína Spo0M de *B. subtilis* en diferentes bacterias y arqueas. Para ello, se obtuvo una lista de organismos filogenéticamente no relacionados que contienen al gen *spo0m*, de la base de datos KEGG (128). Se empleó la base de datos BacMap (129) para clasificar los organismos seleccionados como esporulantes, no esporulantes o no determinado si esporulan, empleando como criterio de clasificación la presencia de genes marcadores del proceso de esporulación en el género *Bacillus* (130) y *Streptomyces* (131, 132). Se realizó un alineamiento múltiple de 31 secuencias de proteínas ortólogas, seleccionadas de acuerdo a Ciccarelli y col. (133), por estar presentes en todos los genomas secuenciados, utilizando el programa de uso libre MUSCLE (134). Este alineamiento de secuencias se utilizó posteriormente para estimar distancias de similitud genética entre las proteínas seleccionadas, usando el programa PROTDIST de inferencia de filogenias, obtenido del paquete PHYLIP (135). De acuerdo a las distancias estimadas, se obtuvieron agrupamientos sucesivos de linajes usando el algoritmo de “neighbor-joining” implementado por Zhang y Nei (136) en el programa de uso libre NEIGHBOR (135). Los resultados se representan en el árbol filogenético de la figura 22, generado utilizando el servidor web iTol (137).

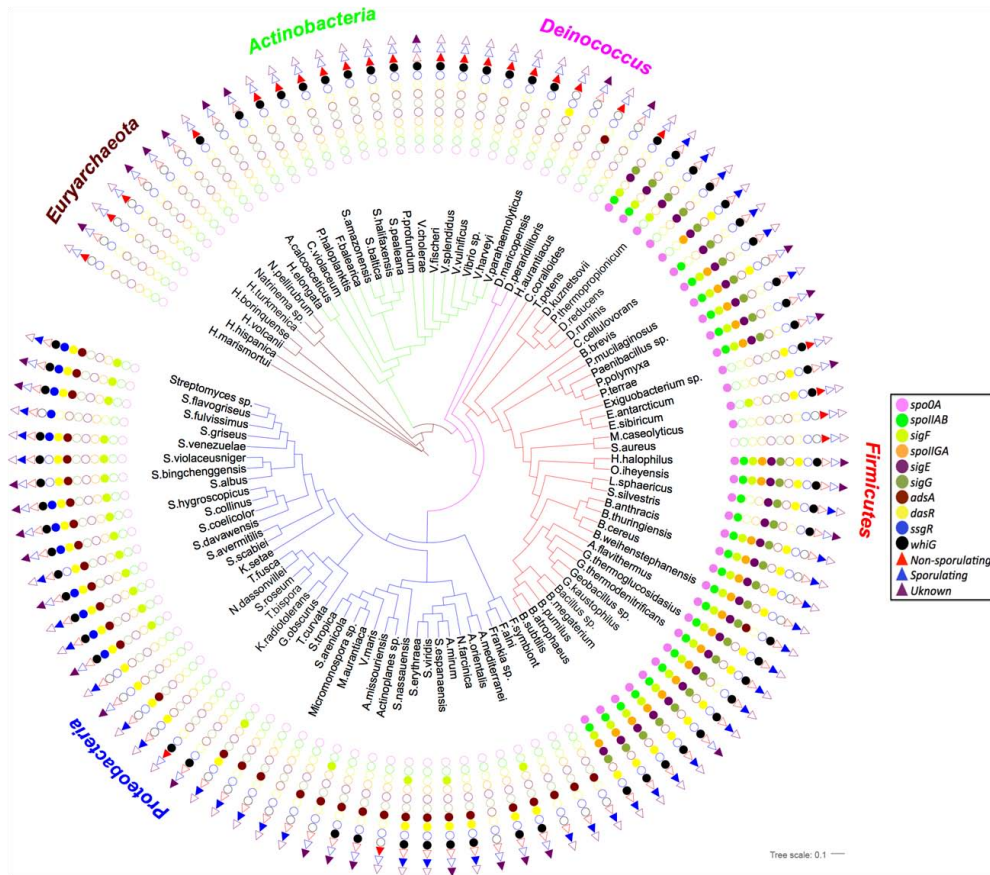


Figura 22. HOMÓLOGOS DE Spo0M SE ENCUENTRAN PRESENTES EN GÉNEROS BACTERIANOS Y DE ARQUEAS ESPORULANTES Y NO ESPORULANTES. Utilizando secuencias de proteínas homólogas a Spo0M, obtenidas de las bases de datos de GenBank, se construyó un árbol filogenético, en donde se muestra homólogos de esta proteína están presentes en géneros bacterianos y de arqueas que esporulan (triángulo azul), que no esporulan (triángulo rojo) y no determinado si esporulan (triángulo morado), clasificados de acuerdo a la presencia de marcadores específicos de esporulación (esferas de colores).

Como se muestra en el árbol, existen homólogos de la proteína Spo0M tanto en organismos esporulantes como no esporulantes, y se encuentran distribuidos en diversos linajes bacterianos, como Euriarqueotas, Actinobacterias, Dinococcus, Firmicutes o Proteobacterias. La existencia de homólogos de Spo0M en esta amplia distribución de especies constituye un indicio de la contribución de esta proteína en procesos distintos a la esporulación y halla una posible explicación en su participación en el proceso de división celular.

En un estudio reciente realizado por Sonoda y col., se presentó la estructura cristalográfica de Spo0M (Fig. 3) (45). Los resultados corroboran lo reportado previamente, en referencia a que Spo0M contiene

una región de identidad con el dominio N terminal de la familia de las arrestinas visuales (36). Las arrestinas son una familia de proteínas eucariotas ampliamente distribuidas que están involucradas en diversas funciones celulares, como desensibilización de receptores acoplados a proteínas G, endocitosis, transducción de señales y otros (37, 40). A pesar de ser procesos con fines claramente distintos, la endocitosis y la división celular comparten ciertas similitudes con respecto a los eventos de remodelación de membrana que permiten que estos procesos ocurran. Adicionalmente, se ha encontrado que algunas proteínas eucariotas que están involucradas en la endocitosis tienen homólogos bacterianos que participan en el proceso de división celular, como las flotilinas (90), la dinamina (138, 139) y la tubulina (84). La identificación del papel de Spo0M en la división celular de la bacteria podría sugerir una conservación evolutiva funcional entre la familia de las arrestinas y Spo0M. En estudios futuros, sería interesante determinar si la interacción de Spo0M con los elementos constitutivos del divisoma ocurre a través del dominio N, que contiene el motivo conservado de arrestina.

Además, en el análisis de los interactores de Spo0M se identificaron posibles interacciones con cinasas de serina bacterianas (Tabla 3). Las cinasas de serina, treonina y tirosina han sido ampliamente estudiadas en eucariontes (140) e inicialmente se pensaba que eran exclusivas de estos organismos, sin embargo, el descubrimiento de que estas cinasas también participan en procesos de transducción de señales en bacterias brindó una perspectiva distinta de las redes de regulación bacterianas (141). Se ha demostrado que miembros de la familia de las arrestinas interactúan con cinasas de tirosina que componen la vía de la cinasa MAP, y con otras cinasas de serina y treonina, como la cinasa Akt (40). La confirmación de la interacción de Spo0M con las cinasas identificadas en nuestro análisis podría constituir otra evidencia de la función de Spo0M como una arrestina bacteriana y podría demostrar que la diversa gama de funciones de la familia de las arrestinas, la mayoría debida a su capacidad como adaptador, se conserva también en bacterias.

Este trabajo constituye el primer reporte de una posible conservación evolutiva de la función de las arrestinas en una proteína bacteriana.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

En este trabajo se reporta una nueva función de la proteína Spo0M de *B. subtilis* como elemento importante durante el proceso de división celular. Esta proteína es considerada como un regulador de la etapa cero de la esporulación y en este trabajo se presentan nuevas oportunidades de estudio de la función de Spo0M no sólo en la esporulación, sino como un elemento que puede estar relacionado con la división celular, tanto en la fase de vida vegetativa como en este proceso de diferenciación. La expresión de Spo0M no se restringe a la fase de esporulación, sino que se observa desde la fase de crecimiento vegetativo, y su localización subcelular está relacionada con su funcionalidad. Adicionalmente, se abre la posibilidad de analizar si Spo0M está involucrado en etapas más avanzadas de la esporulación, como en la formación del córtex y/o abrigo, y no sólo en las etapas iniciales.

PERSPECTIVAS

1. Determinar experimentalmente si *spo0M* tiene un promotor σ^A .
2. Determinar si Spo0M podría estar relacionado con la organización de la membrana plasmática, o la correcta segregación y/o posicionamiento del cromosoma durante la división celular.
3. Corroborar la interacción de Spo0M con las proteínas del citoesqueleto reportadas, con técnicas de microscopía de súper resolución, como FRET o FLIM.
4. Analizar la interacción de Spo0M con otras proteínas relacionadas con la división celular o el citoesqueleto, encontradas en los experimentos de pull down, como DivIVA.
5. Analizar la interacción de Spo0M con otras proteínas encontradas en los experimentos de pull down, como cinasas o proteasas.

6. Analizar el proteoma y el transcriptoma de una cepa silvestre y una cepa nula en *spo0M*, en medio rico y en medio de esporulación, y determinar las diferencias que existen debido a la ausencia de este gen, con respecto a la cepa silvestre.

7. A partir de los resultados anteriores, determinar si Spo0M podría considerarse como una arrestina bacteriana.

REFERENCIAS

1. Piggot PJ, Hilbert DW. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 7:579–586.
2. Tojo S, Hirooka K, Fujita Y. 2013. Expression of *kinA* and *kinB* of *Bacillus subtilis*, necessary for sporulation initiation, is under positive stringent transcription control. *J Bacteriol* 195:1656–1665.
3. Al-Hinai MA, Jones SW, Papoutsakis ET. 2015. The Clostridium sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:19–37.
4. Siranosian KJ GA. 1994. Activation of *spo0A* transcription by sigma H is necessary for sporulation but not for competence in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 176:3812–3815.
5. Britton R a, Eichenberger P, Eduardo J, Fawcett P, Monson R, Grossman AD, Gonzalez-pastor JE, Losick R. 2002. Genome-Wide Analysis of the Stationary-Phase Sigma Factor (Sigma-H) Regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184:4881–4890.
6. Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, González-Pastor JE, Liu JS, Losick R. 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 50:1683–1701.
7. Wu JJ, Piggot PJ, Tatti KM, Moran CP. 1991. Transcription of the *Bacillus subtilis spoIIA* locus. *Gene* 101:113–116.
8. King N, Dreesen O, Stragier P, Pogliano K, Losick R. 1999. Septation, dephosphorylation, and the activation of sigma(F) during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 1156–1167.
9. Serrano M, Côte L, Opdyke J, Moran CP, Henriques AO. 2003. Expression of *spoIIIJ* in the prespore is sufficient for activation of σ_G and for sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185:3905–3917.
10. Cutting S, Oke V, Driks A, Losick R, Lu S, Kroos L. 1990. A forespore checkpoint for mother cell gene expression during development in *Bacillus subtilis*. *Cell* 62:239–250.
11. Adams DW, Errington J. 2009. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* 7:642–653.
12. Lutkenhaus J, Pichoff S, Du S. 2012. Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton* 69:778–790.
13. Graumann PL. 2007. Cytoskeletal Elements in Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:589–618.
14. Haeusser DP, Margolin W. 2016. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nat Rev Microbiol* 14:305–319.
15. van Baarle S, Bramkamp M. 2010. The MinCDJ System in *Bacillus subtilis* Prevents Minicell Formation by Promoting Divisome Disassembly. *PLoS One* 5:e9850.
16. Eswaramoorthy P, Erb ML, Gregory JA, Silverman J, Pogliano K, Pogliano J, Ramamurthi KS.

2011. Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. *MBio* 2.
17. Adams DW, Wu LJ, Errington J. 2014. ScienceDirect Cell cycle regulation by the bacterial nucleoid. *Curr Opin Microbiol* 22:94–101.
 18. Pichoff S, Lutkenhaus J. 2005. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol* 55:1722–1734.
 19. Beall B, Lutkenhaus J. 1992. Impaired cell division and sporulation of a *Bacillus subtilis* strain with the *ftsA* gene deleted. *J Bacteriol* 174:2398–2403.
 20. Gueiros-Filho FJ, Losick R. 2002. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev* 16:2544–2556.
 21. Duman R, Ishikawa S, Celik I, Strahl H, Ogasawara N, Troc P, Lowe J, Hamoen LW. 2013. Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. *Proc Natl Acad Sci* 110:E4601–E4610.
 22. Kawai Y, Ogasawara N. 2006. *Bacillus subtilis* EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. *Microbiology* 152:1129–41.
 23. Land AD, Luo Q, Levin PA. 2014. Functional domain analysis of the cell division inhibitor EzrA. *PLoS One* 9:e102616.
 24. Wei Y, Havasy T, McPherson DC, Popham DL. 2003. Rod shape determination by the *Bacillus subtilis* class B penicillin-binding proteins encoded by *pbpA* and *pbpH*. *J Bacteriol* 185:4717–26.
 25. Scheffers DJ, Jones LJF, Errington J. 2004. Several distinct localization patterns for penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 51:749–764.
 26. Garti-Levi S, Hazan R, Kain J, Fujita M, Ben-Yehuda S. 2008. The FtsEX ABC transporter directs cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 69:1018–28.
 27. Margolin W. 2002. Bacterial Sporulation: FtsZ Rings Do Formation of the polar Z ring is a crucial step in the. *Science* (80-) 12:391–392.
 28. Ben-Yehuda S, Losick R. 2002. Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. *Cell* 109:257–266.
 29. Fiche J-B, Cattoni DI, Diekmann N, Langerak JM, Clerte C, Royer C a, Margeat E, Doan T, Nöllmann M. 2013. Recruitment, assembly, and molecular architecture of the SpoIIIE DNA pump revealed by superresolution microscopy. *PLoS Biol* 11:e1001557.
 30. Errington J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 1:117–126.
 31. Han W-D, Kawamoto S, Hosoya Y, Fujita M, Sadaie Y, Suzuki K, Ohashi Y, Kawamura F, Ochi K. 1998. A novel sporulation-control gene (*spo0M*) of *Bacillus subtilis* with a σ H-regulated promoter. *Gene* 217:31–40.

32. Thi Nguyen HB, Schumann W. 2012. The sporulation control gene *spo0M* of *Bacillus subtilis* is a target of the FtsH metalloprotease. *Res Microbiol* 163:114–8.
33. Le ATT, Schumann W. 2009. The Spo0E phosphatase of *Bacillus subtilis* is a substrate of the FtsH metalloprotease. *Microbiology* 155:1122–32.
34. Arrieta-Ortiz ML, Hafemeister C, Bate AR, Chu T, Greenfield A, Shuster B, Barry SN, Gallitto M, Liu B, Kacmarczyk T, Santoriello F, Chen J, Rodrigues CDA, Sato T, Rudner DZ, Driks A, Bonneau R, Eichenberger P. 2015. An experimentally supported model of the *Bacillus subtilis* global transcriptional regulatory network. *Mol Syst Biol* 11:839.
35. Nicolas P, Mäder U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich S, Becher D, Bisicchia P, Botella E, Delumeau O, Doherty G, Denham EL, Fogg MJ, Fromion V, Goelzer A, Hansen A, Härtig E, Harwood CR, Homuth G, Jarmer H. 2012. Condition-Dependent Transcriptome Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* (80-) 1103–1106.
36. Alvarez CE. 2008. On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol Biol* 8:222.
37. Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK, Yates JR, Lefkowitz RJ. 2007. Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12011–12016.
38. Gurevich V V, Gurevich E V. 2013. Structural Determinants of Arrestin Functions. *The Molecular Biology of Arrestins*, 1sted. Elsevier Inc.
39. Kang DS, Tian X, Benovic JL. 2013. β -Arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. *Methods in Enzymology*, 1sted. Elsevier Inc.
40. Gurevich, Gurevich. 2006. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol* 7:236.
41. Patwari P, Lee RT. 2012. An expanded family of arrestins regulate metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 23:216–222.
42. Gurevich V V, Hanson SM, Song X, Vishnivetskiy SA, Gurevich E V. 2011. Progress in Retinal and Eye Research The functional cycle of visual arrestins in photoreceptor cells. *Prog Retin Eye Res* 30:405–430.
43. Xiao K, Sun J, Kim J, Rajagopal S, Zhai B, Villén J, Haas W, Kovacs JJ, Shukla AK, Hara MR, Hernandez M, Lachmann A, Zhao S, Lin Y, Cheng Y, Mizuno K, Ma'ayan A, Gygi SP, Lefkowitz RJ. 2010. Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15299–304.
44. Patwari P, Chutkow W a., Cummings K, Verstraeten VLRM, Lammerding J, Schreiter ER, Lee RT. 2009. Thioredoxin-independent regulation of metabolism by the β -arrestin proteins. *J Biol*

- Chem 284:24996–25003.
45. Sonoda Y, Mizutani K, Mikami B. 2015. Structure of Spo0M, a sporulation-control protein from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun* 71:1488–1497.
 46. Burkholder PR, Giles NH. 1947. Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am J Bot* 34:345–348.
 47. Youngman P, Perkins JB, Losick R. 1984. Construction of a cloning site near one end of Tn917 into which foreign DNA may be inserted without affecting transposition in *Bacillus subtilis* or expression of the transposon-borne *erm* gene. *Plasmid* 12:1–9.
 48. Zhang XZ, Zhang YHP. 2011. Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*. *Microb Biotechnol* 4:98–105.
 49. Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62:293–300.
 50. Anagnostopoulos C, Spizizen J. 1961. Requirements for Transformation in *Bacillus Subtilis*. *J Bacteriol* 81:741–6.
 51. Nicholson, W.L., and Setlow P. 1990. Sporulation, germination and outgrowth., p. 391–450. *In* Harwood, CR and CSM (ed.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Chichester.
 52. Sambrook J FE MT. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2^a Ed. Cold Spring Harbor, N.Y.
 53. Wach A. 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* 12:259–265.
 54. Wilson G a., Bott KF. 1968. Nutritional Factors Influencing the Development of Competence in the *Bacillus subtilis* Transformation System. *J Bacteriol* 95:1439–1449.
 55. Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557–580.
 56. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–82.
 57. Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, Owen DM, Pereira PM, Henriques R. 2016. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nat Commun* 7:1–9.
 58. Bradford MM. 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
 59. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
60. Searle BC. 2010. Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics* 10:1265–1269.
 61. Setlow P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* 101:514–525.
 62. López D, Kolter R. 2010. Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev* 24:1893–1902.
 63. Jensen SO, Thompson LS, Harry EJ. 2005. Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-ring assembly. *J Bacteriol* 187:6536–6544.
 64. Ortiz C, Natale P, Cueto L, Vicente M. 2015. The keepers of the ring: regulators of FtsZ assembly. *FEMS Microbiol Rev* 1–11.
 65. Healy J, Weir J, Smith I, Losick R. 1991. Post-transcriptional control of a sporulation regulatory gene encoding transcription factor sH in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 5:477–487.
 66. Patrick S, Gonzy-treboul G. 1992. Developmental Regulation of Transcription of the *Bacillus subtilis* *ftsAZ* Operon. *Dna Seq* 224:967–979.
 67. Price VA, Feavers IM, Moir A. 1989. Role of sigma H in expression of the fumarase gene (*citG*) in vegetative cells of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* 171:5933–5939.
 68. Carter HL, Wang LF, Doi RH, Moran CP. 1988. *rpoD* operon promoter used by sigma H-RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 170:1617–1621.
 69. Zweers JC, Nicolas P, Wiegert T, van Dijl JM, Denham EL. 2012. Definition of the σ^W Regulon of *Bacillus subtilis* in the Absence of Stress. *PLoS One* 7.
 70. Kitko RD, Cleeton RL, Armentrout EI, Lee GE, Noguchi K, Berkmen MB, Jones BD, Slonczewski JL. 2009. Cytoplasmic acidification and the benzoate transcriptome in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* 4:e8255.
 71. Haldenwang WG. 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* 59:1–30.
 72. Taboada B, Ciria R, Martinez-Guerrero CE, Merino E. 2012. ProOpDB: Prokaryotic operon database. *Nucleic Acids Res* 40.
 73. Martinez-Guerrero CE, Ciria R, Abreu-Goodger C, Moreno-Hagelsieb G, Merino E. 2008. GeConT 2: gene context analysis for orthologous proteins, conserved domains and metabolic pathways. *Nucleic Acids Res* 36.
 74. Mulligan ME, Hawley DK, Entriken R, McClure WR. 1984. *Escherichia coli* promoter sequences predict in vitro RNA polymerase selectivity. *Nucleic Acids Res* 12:789–800.
 75. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res* 14:1188–1190.

76. Camacho a, Salas M. 1999. Effect of mutations in the “extended -10” motif of three *Bacillus subtilis* sigmaA-RNA polymerase-dependent promoters. *J Mol Biol* 286:683–693.
77. Johnson WC, Moran CP, Losick R. 1983. Two RNA polymerase sigma factors from *Bacillus subtilis* discriminate between overlapping promoters for a developmentally regulated gene. *Nature* 302:800–804.
78. Matsuno K, Sonenshein AL. 1999. Role of SpoVG in asymmetric septation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181:3392–3401.
79. Resnekov O, Resnekov O, Driks a, Driks a, Losick R, Losick R. 1995. Identification and characterization of sporulation gene *spoVS* from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177:5628–5635.
80. Zuber P, Losick R. 1987. Role of AbrB in Spo0A- and Spo0B-dependent utilization of a sporulation promoter in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 169:2223–2230.
81. Einhauer a., Jungbauer A. 2001. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods* 49:455–465.
82. Zhao X, Li G, Liang S. 2013. Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *J Anal Methods Chem* 2013:1–8.
83. Bell MR, Engleka MJ, Malik A, Strickler JE. 2013. To fuse or not to fuse: What is your purpose? *Protein Sci* 22:1466–1477.
84. Erickson HP. 1995. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell* 80:367–370.
85. Cha JH, Stewart GC. 1997. The *divIVA* minicell locus of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 179:1671–1683.
86. Strahl H, Hamoen LW. 2012. Finding the corners in a cell. *Curr Opin Microbiol* 15:731–736.
87. Strahl H, Bürmann F, Hamoen LW. 2014. The actin homologue MreB organizes the bacterial cell membrane. *Nat Commun* 5:1–11.
88. Esue O, Cordero M, Wirtz D, Tseng Y. 2005. The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin. *J Biol Chem* 280:2628–2635.
89. Jones LJF, Carballido-López R, Errington J. 2001. Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104:913–922.
90. Dempwolff F, Möller HM, Graumann PL. 2012. Synthetic motility and cell shape defects associated with deletions of flotillin/reggie paralogs in *Bacillus subtilis* and interplay of these proteins with NfeD proteins. *J Bacteriol* 194:4652–4661.
91. Mielich-Süss B, Schneider J, Lopez D. 2013. Overproduction of flotillin influences cell differentiation and shape in *Bacillus subtilis*. *MBio* 4:e00719-13.
92. Yepes A, Schneider J, Mielich B, Koch G, García-Betancur J-C, Ramamurthi KS, Vlamakis H, López D. 2012. The biofilm formation defect of a *Bacillus subtilis* flotillin-defective mutant involves the protease FtsH. *Mol Microbiol* 86:457–71.

93. Donovan C, Bramkamp M. 2009. Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiology* 155:1786–1799.
94. Garti-levi S, Eswara A, Smith Y, Fujita M, Ben-Yehuda S. 2013. Novel modulators controlling entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 195:1475–1483.
95. Driks A. 1999. *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Microbiol Mol Biol Rev* 63.
96. Yudkin MD, Harrison D. 1987. Effect of precisely identified mutations in the *spoIIAC* gene of *Bacillus subtilis* on the toxicity of the sigma-like gene product to *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 209:333–4.
97. McKenney PT, Eichenberger P. 2012. Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 83:245–60.
98. Feucht A, Evans L, Errington J. 2003. Identification of sporulation genes by genome-wide analysis of the {sigma}E regulon of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 149:3023–3034.
99. Ozin AJ, Henriques AO, Yi H, Jr CPM. 2000. Morphogenetic Proteins SpoVID and SafA Form a Complex during Assembly of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *J Bacteriol* 182:1828–1833.
100. Rigden DJ, Galperin MY. 2008. Sequence analysis of GerM and SpoVS, uncharacterized bacterial “sporulation” proteins with widespread phylogenetic distribution. *Bioinformatics* 24:1793–1797.
101. Chen Y, Ray WK, Helm RF, Melville SB, Popham DL. 2014. Levels of germination proteins in *Bacillus subtilis* dormant, superdormant, and germinating spores. *PLoS One* 9:e95781. doi: 10.1371/journal.pone.0095781. eColle.
102. Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K. 2010. Localization of proteins to different layers and regions of *Bacillus subtilis* spore coats. *J Bacteriol* 192:518–24.
103. Beall B, Moran CP. 1994. Cloning and characterization of *spoVR*, a gene from *Bacillus subtilis* involved in spore cortex formation. *J Bacteriol* 176:2003–2012.
104. Hyyryläinen H-L, Marciniak BC, Dahncke K, Pietiäinen M, Courtin P, Vitikainen M, Seppala R, Otto A, Becher D, Chapot-Chartier M-P, Kuipers OP, Kontinen VP. 2010. Penicillin-binding protein folding is dependent on the PrsA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 77:108–27.
105. Egan AJF, Biboy J, van’t Veer I, Breukink E, Vollmer W. 2015. Activities and regulation of peptidoglycan synthases. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 370:20150031.
106. Huang X, Gaballa A, Cao M, Helmann JD. 1999. Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function σ factor, $\sigma(W)$. *Mol Microbiol* 31:361–371.
107. Kang MS, Lim BK, Seong IS, Seol JH, Tanahashi N, Tanaka K, Chung CH. 2001. The ATP-dependent CodWX (HslVU) protease in *Bacillus subtilis* is an N-terminal serine protease. *EMBO J* 20:734–42.

108. Frees D, Savijoki K, Varmanen P, Ingmer H. 2007. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 63:1285–1295.
109. Kotschwar M, Harfst E, Ohanjan T, Schumann W. 2004. Construction and analyses of mutant *ftsH* alleles of *Bacillus subtilis* involving the ATPase- and Zn-binding domains. *Curr Microbiol* 49:180–5.
110. Kanamaru K, Stephenson S, Perego M. 2002. Overexpression of the PepF oligopeptidase inhibits sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184:43–50.
111. Nessler S. 2005. The bacterial HPr kinase/phosphorylase: a new type of Ser/Thr kinase as antimicrobial target. *Biochim Biophys Acta* 1754:126–131.
112. Benson AK, Haldenwang WG. 1993. *Bacillus subtilis* sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2330–4.
113. Mogk A, Homuth G, Scholz C, Kim L, Schmid FX, Schumann W. 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 16:4579–90.
114. Castanié-Cornet MP, Bruel N, Genevaux P. 2014. Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *BBA - Mol Cell Res* 1843:1442–1456.
115. Schulz A, Tzschaschel B, Schumann W. 1995. Isolation and analysis of mutants of the *dnaK* operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 15:421–429.
116. Mayer MP, Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670–684.
117. Baram D, Pyetan E, Sittner A, Auerbach-Nevo T, Bashan A, Yonath A. 2005. Structure of trigger factor binding domain in biologically homologous complex with eubacterial ribosome reveals its chaperone action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12017–12022.
118. Guthrie B, Wickner W. 1990. Trigger factor depletion or overproduction causes defective cell division but does not block protein export. *J Bacteriol* 172:5555–5562.
119. Sinai L, Rosenberg A, Smith Y, Segev E, Ben-Yehuda S. 2015. The Molecular Timeline of a Reviving Bacterial Spore. *Mol Cell* 57:695–707.
120. Schulz a, Schwab S, Homuth G, Versteeg S, Schumann W. 1997. The *htpG* gene of *Bacillus subtilis* belongs to class III heat shock genes and is under negative control. *J Bacteriol* 179:3103–9.
121. Wahlstrom E. 2003. The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 149:569–577.
122. Sugimoto S, Saruwatari K, Higashi C, Sonomoto K. 2008. The proper ratio of GrpE to DnaK is

- important for protein quality control by the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system and for cell division. *Microbiology* 154:1876–85.
123. Msadek T, Dartois V, Kunst F, Herbaud ML, Denizot F, Rapoport G. 1998. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* 27:899–914.
 124. Crozat E, Rousseau P, Fournes F, Cornet F. 2014. The FtsK Family of DNA translocases finds the ends of circles. *J Mol Microbiol Biotechnol* 24:396–408.
 125. Sharp MD, Pogliano K. 2003. The membrane domain of SpoIIIE is required for membrane fusion during *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol* 185:2005–2008.
 126. Eun YJ, Kapoor M, Hussain S, Garner EC. 2015. Bacterial filament systems: Toward understanding their emergent behavior and cellular functions. *J Biol Chem* 290:17181–17189.
 127. Jogler C, Waldmann J, Huang X, Jogler M, Glockner FO, Mascher T, Kolter R. 2012. Identification of Proteins Likely To Be Involved in Morphogenesis, Cell Division, and Signal Transduction in Planctomycetes by Comparative Genomics. *J Bacteriol* 194:6419–6430.
 128. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* 44:D457–D462.
 129. Stothard P, Van Domselaar G, Shrivastava S, Guo A, O'Neill B, Cruz J, Ellison M, Wishart DS. 2005. BacMap: An interactive picture atlas of annotated bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 33.
 130. De Hoon MJL, Eichenberger P, Vitkup D. 2010. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr Biol* 20.
 131. Girard G, Traag BA, Sangal V, Mascini N, Hoskisson PA, Goodfellow M, van Wezel GP. 2013. A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. *Open Biol* 3:130073.
 132. Ohnishi Y, Seo JW, Horinouchi S. 2002. Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 216:1–7.
 133. Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P. 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* (80-) 311:1283–1287.
 134. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797.
 135. Felsenstein J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences. Univ Washingt Seattle Distributed by the author. Department of Genome Sc.
 136. Zhang J, Nei M. 1997. Accuracies of ancestral amino acid sequences inferred by the parsimony, likelihood, and distance methods. *J Mol Evol* 44.

137. Letunic I, Bork P. 2007. Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23:127–128.
138. Bürmann F, Ebert N, Van Baarle S, Bramkamp M. 2011. A bacterial dynamin-like protein mediating nucleotide-independent membrane fusion. *Mol Microbiol* 79:1294–1304.
139. Dempwolff F, Wischhusen HM, Specht M, Graumann PL. 2012. The deletion of bacterial dynamin and flotillin genes results in pleiotrophic effects on cell division, cell growth and in cell shape maintenance. *BMC Microbiol* 12:298.
140. Pawson T, Scott JD. 2005. Protein phosphorylation in signaling: 50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 30:286–290.
141. Cousin C, Derouiche A, Shi L, Pagot Y, Poncet S, Mijakovic I. 2013. Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. *FEMS Microbiol Lett* 346:11–19.
142. Krämer R. 2012. Research group Prof. Dr. Reinhard Krämer. <http://www.kraemerlab.uni-koeln.de>.

Analysis of Spo0M function in *Bacillus subtilis*

Short title: Role of Spo0M in *Bacillus subtilis*

Luz Adriana Vega-Cabrera¹, Adán Guerrero², José Luis Rodríguez-Mejía¹, María Luisa Tabche¹, Christopher D. Wood², Rosa-María Gutiérrez-Rios¹, Enrique Merino¹, Liliana Pardo-López^{1*}

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo, Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, México; adavcab@ibt.unam.mx (LAVC), joserome@ibt.unam.mx (JLRM), tabche@ibt.unam.mx (MLT), rmaria@ibt.unam.mx (RMGR), merino@ibt.unam.mx (EM) liliana@ibt.unam.mx (LPL)

²Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Avenida Universidad 2001, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62210, Morelos, México; adanog@ibt.unam.mx (AG), chris@ibt.unam.mx (CDW)

*Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: liliana@ibt.unam.mx; Tel.: +52-777-3291-624; Fax: +52-777-3291-624

Abstract

Spo0M has been previously reported as a regulator of sporulation in *Bacillus subtilis*; however, little is known about the mechanisms through which it participates in sporulation, and there is no information to date that relates this protein to other processes in the bacterium. In this work we present evidence from proteomic, protein-protein interaction, morphological, subcellular localization microscopy and bioinformatics studies which indicate that Spo0M function is not necessarily restricted to sporulation, and point towards its involvement in other stages of the vegetative life cycle. In the current study, we provide evidence that Spo0M interacts with cytoskeletal proteins involved in cell division, which suggest a function additional to that previously described in sporulation. Spo0M expression is not restricted to the transition phase or sporulation; rather, its expression begins during

the early stages of growth and Spo0M localization in *B. subtilis* depends on the bacterial life cycle and could be related to an additional proposed function. This is supported by our discovery of homologs in a broad distribution of bacterial genera, even in non-sporulating species. Our work paves the way for re-evaluation of the role of Spo0M in bacterial cell.

Introduction

Bacillus subtilis, an aerobic Gram-positive bacterium, has been widely used as a model to study processes such as sporulation and heterologous protein production. Sporulation in *B. subtilis* is a cell differentiation process, which allows cells to withstand adverse conditions. Sporulation in *B. subtilis* is triggered by the phosphorylation of the sensor histidine kinases KinA-E that in turn initiates a phosphorelay pathway which culminates in the phosphorylation of the master regulator of sporulation, Spo0A [1]. The phosphorylation level of Spo0A determines the alternative differentiation states that the cell adopts in response to adverse environmental circumstances [1]. These states include competence, biofilm formation, cannibalism and sporulation, with the latter representing the last resort for cell survival.

The first stage of differentiation is known as stage zero and encompasses the decision of the cell to enter the process. During stage I the bacterial chromosome is duplicated and an axial filament is formed, with the chromosome bound to both cell poles. At stage II, cells acquire sporulation commitment and are subject to asymmetrical division, an irreversible decision that generates the forespore and the mother cell. In stage III the mother cell membrane migrates around the forespore, in a process known as engulfment. Stage IV and V include the formation of the protective structures of the spore, the coat and the cortex. In stage VI and stage VII the spore matures and is released after the lysis of the mother cell [2]. From the beginning of the asymmetrical division both new compartments turn on different genetic programs directed by specific sigma factors that drive the subsequent steps.

The Spo0M protein has been shown to be involved in sporulation [3]; however, the mechanism by which it performs this function has not been elucidated. A *spo0M* null mutant is viable; however, when the intracellular concentration of Spo0M is low, sporulation is diminished and blocked at stage zero; additionally, cells at the vegetative stage are susceptible to lysis [3]. Similarly, overexpression of Spo0M also inhibits

sporulation at stage zero, suggesting that Spo0M concentrations are strictly regulated. This regulation is known to be mediated through proteolytic degradation by the metalloprotease FtsH, that has been shown to degrade Spo0M *in vitro* [4]. It was first reported that Spo0M is under the control of the stationary phase sigma factor σ^H [3], however, recent work has indicated that Spo0M is also regulated through the stress responsive sigma factor σ^W [5–7]. Finally, it has been reported that when intracellular concentrations of Spo0M are low, the expression of Spo0A is down-regulated [3]. To date, the mechanisms by which Spo0M regulates sporulation, the details of Spo0M's association with Spo0A, and the involvement of Spo0M in processes other than sporulation have not been reported.

Cell division and sporulation require the assembly of a septum to initiate the cascade of events that will ultimately produce a new cell: a daughter cell in the case of cell division and a spore in the case of sporulation. Assembly of the Z ring, a structure composed of FtsZ subunits, is the first step in both processes, and most of the elements involved in regulating the polymerization and membrane tethering of FtsZ are also shared between the two. The Z ring is stabilized and tethered to the cell membrane through positive regulators such as FtsA, [8], ZapA [9] and SepF [10] and by negative regulators like EzrA [11]. Medial and asymmetrical divisions differentiate in the way the chromosome is segregated and how cytokinesis is achieved after septum formation. During medial division, the MinCD system avoids the formation of aberrant septa near the cell poles [12,13] and the Nucleoid Occlusion (NOC) system prevents septum formation in the middle of the cell before the chromosome is segregated [12,13]; cytokinesis is achieved under the direction of a large number of elements, including transporters (e.g., FtsE/X) [14], cell wall synthesis machinery (e.g., PBP1A and PBP2) [15], and various proteins that act to recruit additional components (reviewed by [16–18]). The protein complex involved in this process is known as the divisome.

During sporulation, the SpoIIE phosphatase regulates the re-localization of the septum from the medial to polar position [19]; after septum establishment one third of the chromosome is retained in the forespore and the rest of the chromosome is translocated by the SpoIIIE ATPase [20]. Unlike medial division, cell wall is not newly synthesized but removed, allowing engulfment to proceed [21] and cytokinesis is replaced by the lysis of the mother cell.

In the current study, we provide evidence that Spo0M functions are not restricted to sporulation, but could also regulate vegetative stage processes of *B. subtilis*, specifically, during cell division. We found that the *spo0M* null mutant is morphologically altered, showing elongation and membrane defects not present in wild type cells. Here we demonstrate that Spo0M expression begins during early stages of growth, which suggest an additional role in the vegetative stage of life of *B. subtilis*. We analyzed the Spo0M localization within the cells using a fluorescent fusion with the DsRed protein, finding that this fusion is located to the cell poles and the septum region, where it colocalizes with the cell division related protein ZapA. Finally, we determined that Spo0M interacts with cell division and membrane organization proteins, chaperones, kinases, proteases and proteins involved in sporulation; this supports our hypothesis that Spo0M is not restricted to the sporulation stage and instead it is involved in other processes during the vegetative growth in *B. subtilis*. Our findings lay a foundation for future investigation of the unexplored functions of Spo0M, whose role has been previously reported only as a regulator of sporulation.

Materials and methods

General methods

The strains we used in this work are isogenic derivatives of *B. subtilis* 168 [22] or PY79 [23]; additionally, we used the hypercompetent strain SCK6 [24]. Competent *B. subtilis* cells were prepared as previously described [25]. Strain FG347, *amyE::P_{xyt}-gfp-zapA* (*cat*) [9] was previously constructed and kindly provided by Dr. Sarah Wacker from Dr. R. Losick's group. Strain Δ 0M was constructed by allelic replacement of the *spo0M* open reading frame with a kanamycin resistance cassette, constructed using a long-flanking PCR method [26]. This construct was incorporated in the SCK6 and FG347 strains to generate *spo0M* null mutants in these genetic backgrounds. The Spo0M-DsRed fusion construct was generated by designing a pSGGS plasmid (S2 Table) to possess the same genetic backgrounds mentioned above. Antibiotics were used at the following concentrations: chloramphenicol, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; erythromycin, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; kanamycin, 15 or 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$; spectinomycin, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. DNA manipulation and cloning were performed according to

standard methods [27]. *Taq* and *Phusion* DNA polymerases (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and an Expand Long Template PCR system (Roche, Mannheim, Germany) were used for PCR reactions. The oligonucleotide primers used in this study are listed in S3 Table. Oligonucleotide synthesis and sequencing was performed by the Departmental DNA Synthesis and Sequencing facility of IBt-UNAM. The strains and plasmids used in this study are listed in S2 Table. Plasmid construction is further described in the S1_File.

Spore resistance test

Strains were cultured in 2XSG sporulation agar for 6 days at 37°C. After this, viable spores were collected and quantified. A total of 1×10^6 spores were used for analysis. To assay wet heat resistance, spores were diluted in 1 mL of sterile water and incubated at 80°C for 30 min. To assay chemical resistance, spores were diluted in 1 mL of sterile water, and 1500 μ m of commercial bleach was added. The spores were then incubated with the bleach for 30 min, harvested and resuspended in sterile water. After each treatment, a 100 μ L aliquot of sample was plated on LB agar, and the number of viable spores was quantified. We performed at least three biological replicates of each experiment mentioned above.

Microscopy

Cultures were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium [28], Spizizen minimal medium [29] and 2XSG sporulation medium [30]. The last two were supplemented with 0.1% glucose and 0.1% bacto casamino acid. If necessary, xylose was added (0.1% final concentration) to induce the expression of GFP:ZapA. Cells were harvested, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS), and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), if necessary. The cells were stained with 0.01 mg mL⁻¹ FM4-64 (F34653, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (final concentration), 0.01 mg mL⁻¹ Hoechst 33342 (H3570, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or 0.01 mg mL⁻¹ 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide (DAPI) (D1306, Invitrogen) (final concentration). Following this, the cells were observed with an inverted Olympus FV1000 IX81 confocal microscope using a UPLSAPO 60XS/1.3 Ph3 silicon oil immersion objective; or with an Olympus IX81 TIRF microscope using a UAPON-OTIRF 100X/1.49 oil immersion objective. Fluorescence measurements were always performed with the same hardware settings (e.g., laser intensity, sampling,

acquisition rate, pinhole and amplification settings) in the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (National Laboratory of Advance Microscopy). Images were analyzed with open-source Fiji–ImageJ software [31].

Super-resolution microscopy

All super-resolution imaging measurements were performed on an Olympus IX-81 inverted microscope configured for total internal reflection fluorescence (TIRF) excitation (cellTIRF Illuminator; Olympus). The excitation angle was set up such as the evanescence field had a penetration depth of about ~ 500 nm (Xcellence software v1.2; Olympus Soft Imaging Solution GMBH). The samples were continuously illuminated using excitation sources depending on the fluorophore used. Blue (Hoechst), green (GFP) and red (FM4-64; Ds-RED) were excited with either a 405, 491-nm or a 568-nm diode-pumped solid-state laser, respectively. The maximum laser power, measured at the back of the focal plane of the objective lens, ranged between 20 to 25 mW, depending in the laser line used. Beam selection and modulation of laser intensities were controlled via Xcellence software v.1.2. A full multiband laser cube set was used to discriminate the selected light sources (LF 405/488/561/635 A-OMF, Bright Line; Semrock). Fluorescence was collected using an Olympus UApo N 100 \times /1.49-numerical-aperture oil-immersion objective lens with an extra 1.6 \times intermediate magnification lens. All movies were recorded on a full chip mode of an EMCCD camera (Andox, Ixon 888) at 100 nm per pixel. Sub-diffraction images were derived from the Super Resolution Radial Fluctuation (SRRF) analysis [32]. For each super-resolution reconstruction (x, y, z), five to then serial stacks were acquired within the evanescent field, with an axial ‘z’ spacing of 100 nm. Each serial stack, composed of 300 temporal images collected with an exposure time of 5-20 ms and at 6-7 Hz, was fed into NanoJ-core and NanoJ-SRRF plugins of Image J [31,32]. The following parameters were considered: ring radius 0.5, radially magnification 10, axes in ring 10; all other parameters were set up as the default options. The radially maps were drift corrected using pre-calculated drift tables obtained with the Estimate Drift tool of NanoJ-SRRF, considering a time averaging of 300 images. These drift-corrected radially maps were then finally integrated on a super-resolution image by means of calculating the second order cumulant of the temporal radially auto-correlations. Fluorescence measurements were always

performed with the same hardware settings (e.g., laser intensity, sampling, acquisition rate, pinhole and amplification) in the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (National Laboratory of Advance Microscopy). Images were analyzed with Fiji–ImageJ software [31].

Imaging flow cytometry

Septum formation was analyzed by quantifying fluorescence intensity in an Amnis Image Stream Mark II imaging flow cytometer. Cells from the strains FG347 and GFP:ZapA: Δ 0M were grown in rich medium until exponential phase (OD_{600} 0.6-0.8) and GFP:ZapA expression was induced by adding 0.1% xylose (final concentration) for 4h. Samples were run until 5×10^3 cells were recorded for each biological repetition and the reported data correspond to three biological repetitions.

Western blot

SDS-PAGE was performed as reported by Laemmli [33]. Primary antibodies were detected using HRP-conjugated secondary antibodies, which was followed by enhanced chemiluminescence detection (ECL; GE, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's protocol. The same procedure was followed to evaluate co-immunoprecipitation assays using FtsZ-FLAG and GFP-FLAG. The following commercial antibodies were acquired: anti-FtsZ (AP10076PU-N, Agrisera, Vänäs, Sweden), anti-GFP (GTX113617, GeneTex, Alton Pkwy, Irvine, CA, U.S.), anti-DsRed (GTX59862, GeneTex), anti-DsRed (GTX82561, GeneTex) and anti-FLAG (F1804, Sigma).

Interactome

T7-MAT-Spo0M-FLAG plasmid construction is described in the Supporting Information section. The plasmid was transformed into the BL21-DE3 *E. coli* strain, and protein expression was induced by incubation with 0.5 mM IPTG (final concentration) for 6-8 h in LB medium. After induction, the cells were harvested and resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4; 2.5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10% glycerol; 1% NP40; protease

inhibitor cocktail (Roche); phosphatase inhibitor cocktail (Roche)). The samples were sonicated, and total protein extract was collected. Total protein extract from an empty vector (pT7-MAT-FLAG) was used as a control. Total protein extracts were also obtained from the Bs1A1 wild type *B. subtilis* strain, as described above, and were mixed with the control and experimental samples for 2 h at 4°C. Following this, both mixtures were incubated with anti-FLAG agarose beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 2 h at 4°C. The samples were then washed with lysis buffer and loaded onto an SDS-PAGE gel. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (BioRad, Hercules, CA, USA) and analyzed to identify differential bands between the control and experimental samples. We performed three biological replicates of the experiment. Bands of interest were excised and sent to the Proteomics Discovery Platform in the Institute de Recherches Cliniques de Montréal, Canada, for mass spectrometry analysis. The results were analyzed using Scaffold 4.4.7 commercial software [34].

Coimmunoprecipitation assays

Immunoprecipitations with the anti-FtsZ or anti-GFP antibodies were performed by mixing 1 mg of total protein from the lysates of the Spo0M:DsRed or the induced GFP:ZapA/Spo0M:DsRed strains with an anti-DsRed antibody for 3 h at 4°C. After this, 50 µL protein A agarose beads (sc-2001, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, U.S.) were added to the mixture and incubated for 3 h at 4°C. The presence of FtsZ or GFP:ZapA was revealed by Western blotting with an anti-FtsZ or anti-GFP antibody. In the reverse order experiment, 1 mg of total protein from lysate of the Spo0M:DsRed or strain was mixed with an anti-FtsZ antibody for 3 h at 4°C. After this, 50 µL protein A agarose beads were added to the mixture and incubated for 3 h at 4°C. The presence of Spo0M:DsRed was revealed by Western blotting with an anti-DsRed antibody.

Bioinformatics procedures

Analysis of the sporulation phenotypes of strains carrying the *spo0M* gene

A list of representative bacteria carrying the *spo0M* gene was obtained from the KEGG database [35]. Each member of this set of organisms was classified as sporulating or non-sporulating bacteria in accordance with the BacMap database [36] or based on the presence of gene markers associated with the sporulation process in the genera *Bacillus* [37] and *Streptomyces* [38,39]. The results of the analysis were represented as a phylogenetic tree. To construct this tree, a multiple alignment of the concatenation of 31 ortholog protein sequences that were selected by Ciccarelli *et al.* [40] for being universally present among sequenced genomes was obtained using the MUSCLE alignment program [41]. This sequence alignment was used to estimate genetic distances using PROTDIST from J. Felsenstein's PHYLIP phylogeny inference package program [42]. On the basis of these estimated distances, successive clustering of lineages was performed using a neighbor-joining algorithm reported by Zhang and Nei [43], as implemented in the NEIGHBOR program [43]. The resulting tree was drawn using the iTol web server [44].

Analysis of σ^A promoter sequences of *spo0M* gene

The transcription units of representative organisms of the genus *Bacillus* carrying the *spo0M* gene were obtained from the ProOpDB operon database [45] and their corresponding 5' intergenic regions were obtained from the GeConT web server [46]. These sequences were used to search for potential binding sites of the housekeeping σ^A using the algorithm of Mulligan *et al.* [47] and then represented as a logo using the WebLogo server [48].

Results and discussion

Spo0M homologs are found in non-sporulating bacteria

We started with the analysis of the function of Spo0M by determining which bacteria have homologs of this protein. As described in Materials and methods, we identified orthologs to Spo0M by employing the KEGG orthologous database. All the prokaryote proteins considered in the set were related to the KO K06377 data set, defined as sporulation-control protein, using the default parameters [35]. Then, we classified the bacteria in the set as sporulating, non-sporulating or not determined, considering the annotations provided by the

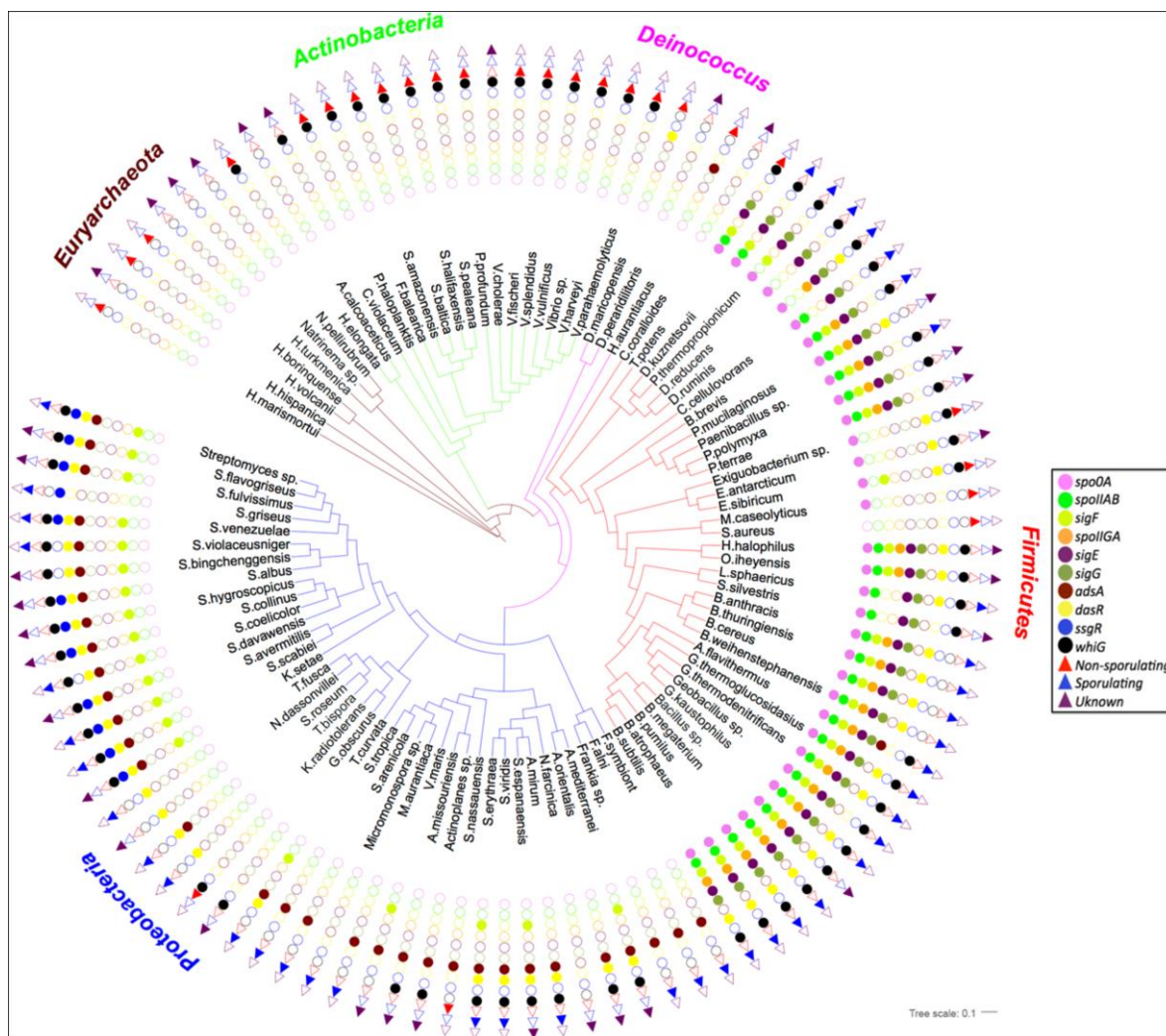
BacMap database [36]. Using the same approach as for Spo0M, we searched for orthologs of different proteins described to participate in sporulation, such Spo0A, the master regulator of sporulation, the sigma factors known to induce the genes involved in the cascade of sporulation both in *Bacilli* and *Streptomyces* (see Materials and methods), and some other genes, like *spoIIA*, reported to be induced during sporulation in *B. subtilis*. As shown in Fig 1, Spo0M homologs were not restricted to sporulating phyla like Firmicutes and Actinobacterias; they were also found in non-sporulating phyla, such as Euryarchaeota, Deinococcus, Chloroflexi, and Proteobacteria. It is interesting to note that in some species, such as *Exiguobacterium sp. AT1b*, *Exiguobacterium sibiricum 255-15*, *Macrococcus caseolyticus JCSC5402*, and *Thermincola potens JR*, the first three from the class *Bacilli* and the last one classified as *Clostridia*, in spite of having orthologs of Spo0A and Spo0M, the organism do not sporulate. Additionally, it is worth noting, that the rest of the orthologs of the sigma factors needed for the subsequent steps of sporulation are not present in these bacteria, so the presence of Spo0A may be related to other processes separate from sporulation. This observation, also suggests that the functional role of Spo0M should not only be restricted to sporulation (Fig 1) and opens the possibility of characterizing the function of Spo0M in depth.

Fig 1. Spo0M homologs are found in non-sporulating bacteria. A list of representative bacteria carrying the *spo0M* gene was obtained, and each member was classified as sporulating (blue triangle) or non-sporulating (red inverted triangle) or not determined (purple triangle) according to the BacMap database [36] or based on the presence of gene markers associated with the sporulation process (color circles). A multiple alignment of the concatenation of 31 orthologous protein sequences was obtained and used to estimate the genetic distances of the organisms. A clustering of lineages was performed and used to construct the shown phylogenetic tree.

Spo0M null mutant displays morphological differences in cells grown in rich medium compared to wild type cells

A previously reported *spo0M* null mutant is blocked at stage zero of sporulation and is susceptible to lysis during vegetative growth [3]. However, it has not been reported whether

Fig 1.



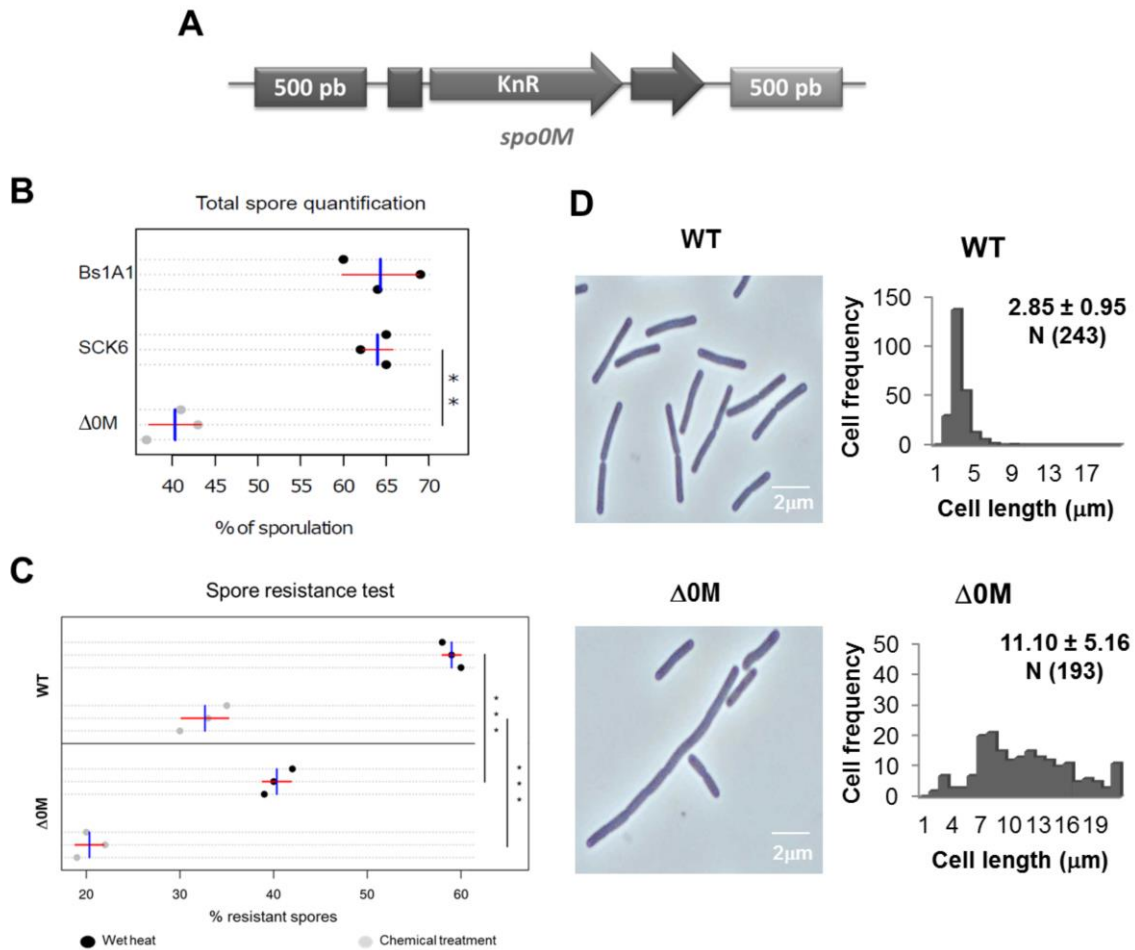
this null mutant is defective in any other processes during vegetative growth or even if it is affected in other stages of sporulation. Therefore, we generated a *spo0M* null mutant ($\Delta 0M$) by introducing an antibiotic resistance cassette into the middle of the gene (Fig 2A) and then analyzed the physiology and phenotype of the resulting strain. We found that the growth rate of this mutant was not affected in either rich or sporulation media (S1A and S1B Figs); however, there was an effect with regard to the total number of spores generated by this strain (Fig 2B). Han *et al.* previously reported that a *spo0M* null mutant generated in the *B. subtilis* 168 strain has impaired sporulation ability, mainly in nutritionally rich medium (the mutant strain generates 90-99% fewer spores than the parental strain) but also

in sporulation medium (generating 25-90% fewer spores than the parental strain in this case) [3]. Our results using the SCK6 strain are concordant with the referenced study: we observed a 20-25% decrease in sporulation in the mutant strain compared to the parental strain when grown in sporulation medium (Fig 2B). It should be noted that the total number of spores generated by the SCK6 strain was similar to the total number of spores generated by the wild type *B. subtilis* 168 strain (Bs1A1), which was evaluated in a previous report [3] (Fig 2B). Additionally, we assessed spore resistance to treatments with wet heat and chemicals (see Materials and methods). The spores generated by the *B. subtilis* Δ 0M strain were less resistant to both treatments (Fig 2C). Heat resistance and resistance to chemical hazards are conferred upon the spore by the mineralization of its core, through the association of DNA to the Small Acid Soluble Proteins (SASPs) and by coat specific elements [49] that are expressed from σ^E and σ^K promoters from stage II of sporulation [49,50]. The fact that spores generated by the *spo0M* null mutant are less resistant than the wild type spores suggest that Spo0M could be involved in later stages of the sporulation process and not just at stage zero. Further analyses to determine how Spo0M might affect spore resistance are necessary.

Fig 2. *spo0M* null mutant shows morphological alterations compared to the wild type strain. We generated a *spo0M* null mutant by allelic replacement of a p Δ 0M construct (A) (see S1_File) in the *spo0M* gene. KnR, kanamycin resistance cassette. **B.** Spore quantification for the wild type and mutant strains. The wild type and mutant strains were cultured in Spizizen sporulation medium for 40 h. The total number of spores in each sample was quantified manually using a bright field microscope. The Δ 0M strain generated 20-25% fewer spores than the wild type strain. The sporulation efficiency of the SCK6 parental strain was similar to that of the wild type Bs1A1 strain. **C.** Analysis of spore resistance in wild type and mutant strains. Spores of wild type and mutant strains were generated in 2XSG medium and subjected to wet heat and chemical treatment as mentioned in Materials and methods. Mutant spores are less resistant to both treatments, compared to those generated by the wild type strain. Data was analyzed through an ANOVA test, with a *p* value of 0.001, blue bar corresponds to the mean value and red bar represents the standard deviation. **D.** We analyzed the phenotype of the mutant strain using light microscopy and

observed that the mutant adopted an elongated appearance compared with the wild type strain. Cell length was measured using the Fiji–ImageJ software [31].

Fig 2.



Phenotypic analysis of $\Delta 0M$ mutant cells showed that approximately 30% of these cells appeared relatively elongated compared to the parental strain when cultured in rich medium until exponential phase (OD_{600} 0.4 – 0.6; 1 – 3h of culture). Using the Fiji-ImageJ software [31], we determined that the cell length distribution of the $\Delta 0M$ cells was significantly different (approximately two- to five-fold longer, being the mean value $11.10 \pm 5.16 \mu\text{m}$ ($N=193$)) to that of the wild type cells, (mean value of $2.85 \pm 0.95 \mu\text{m}$ ($N=243$)) (Fig 2D). The presence of elongated cells suggests impairment or a delay in cell division

that leads to excessive cell growth before a normal mid-division generates two daughter cells.

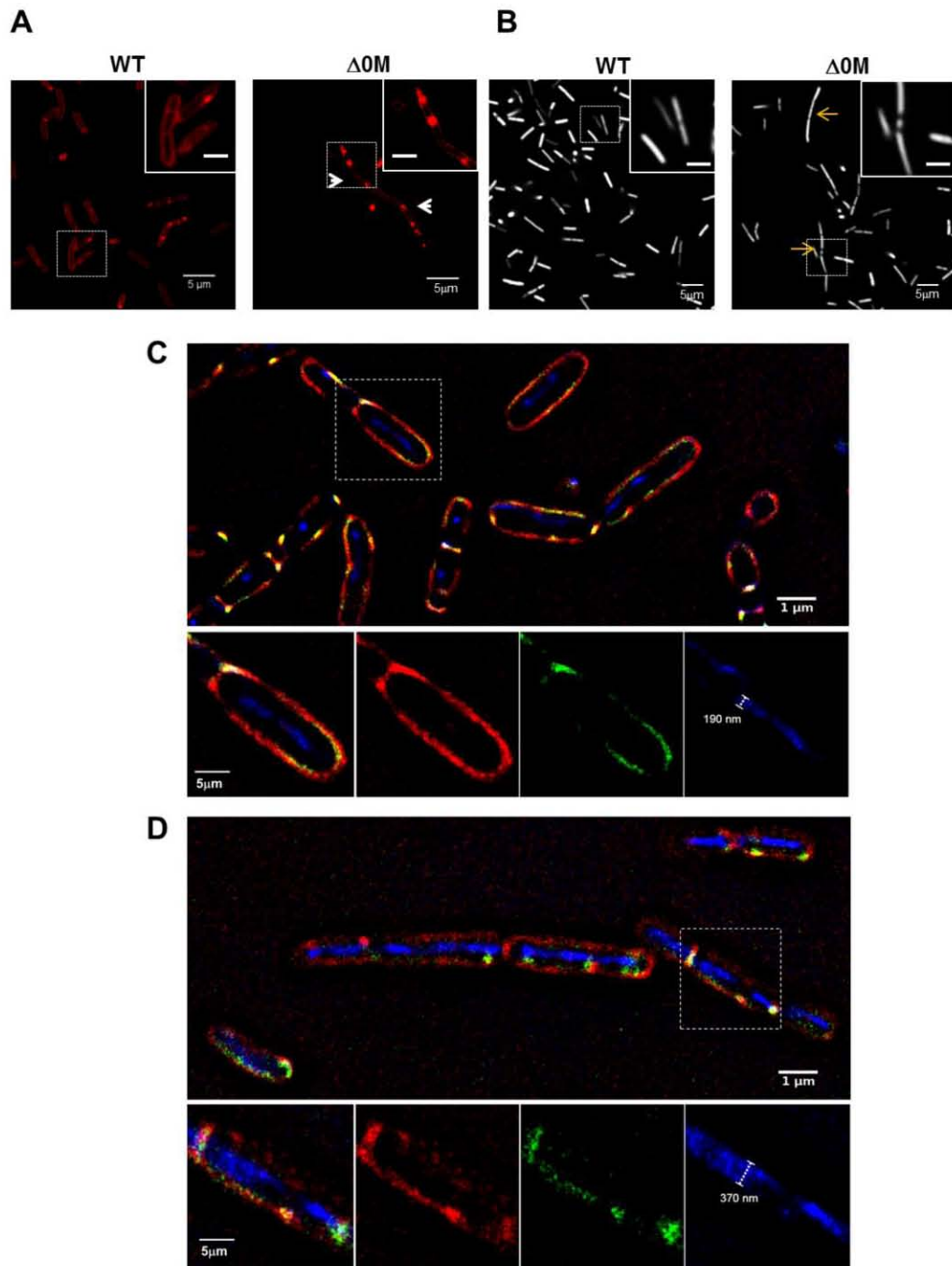
We then stained the wild type and mutant cells with the membrane dye FM4-64 and the DNA marker Hoechst to further examine their structural elements. The mutant cells exhibited unique membrane morphology, showing apparent slight curvature and cell bending, which were not observed in the wild type cells (Fig 3A). Additionally, DNA structure in the cell is also altered, appearing as de-condensed or guillotined (Fig 3B).

Fig 3. $\Delta 0M$ mutant strain shows morphological alteration when compared with the wild type strain. **A.** The wild type and mutant cells were stained using the membrane dye FM4-64, and the cells were visualized by confocal microscopy. The *spo0M* null mutant cells had unique morphological features in their membranes, such as slight curvature (white arrow heads), which were not present in the wild type cells. **B.** The wild type and mutant cells were stained with the DNA marker Hoechst and observed by confocal microscopy. There are alterations in the DNA of the $\Delta 0M$ strain, that appears to be decondensed or guillotined (orange arrows). Scale bar inside the box is 1 μm . Cells from the GFP:ZapA and GFP:ZapA: $\Delta 0M$ induced strains were stained with FM4-64 and Hoechst and were analyzed using super resolution microscopy **C.** Wild type cells . **D.** $\Delta 0M$ mutant cells show elongated bacilli with containing several DNA packages and these appear decondensed, when measured and compared to the wild type cell DNA. Images were analyzed using the Fiji–ImageJ software [31].

Cell division is a complex process that begins with the formation of a septum and ends with the constriction of the Z ring. A large number of proteins and membrane elements are needed to accomplish the process [12,18]. As the establishment of the septum is a key step in cell division, we sought to determine whether Spo0M is involved in this process. To accomplish this, we analyzed septum formation and localization in wild type and $\Delta 0M$ mutant cells using the fluorescent fusion protein GFP:ZapA in the FG347 strain (S2 Table). ZapA (Z ring-associated protein) is a membrane protein component of the divisome that is recruited during the early stages of septum formation; it stimulates FtsZ

polymerization and stabilizes the divisome's association with the membrane. Because ZapA colocalizes with FtsZ, it can be used as a septum marker [9].

Fig 3.



Septum formation was analyzed by quantifying fluorescence intensity in an Amnis Image-Stream Mark II flow cytometer and data were processed using the IDEAS 6.1 software (Amnis Corporation). Septum formation rate was not altered in the Δ 0M mutant cells and occurred in the same proportion as found in wild type cells ($53.8 \pm 4.4\%$ of wild type cells formed a septum, whereas $51.8 \pm 5.7\%$ of mutant cells formed a septum under the tested conditions). We evaluated septum formation and localization using super-resolution microscopy (Figs 3C and 3D). Compared with wild type cells (Fig 3C) *spo0M* null mutation generates chains of bacilli of variable length, some of them containing several DNA packages, or one long DNA fiber, and these fibers have a de-condensed appearance (Fig 3D and S1 Video). Using the Fiji-ImageJ software [31], we measured the diameter of DNA fibers in wild type and mutant cells and found that the diameter of the DNA fibers present in the mutant cells is significantly greater than that found those of wild type cells (S2 Fig), which supports the hypothesis that DNA might be decondensed in the *spo0M* null mutants. While cell morphology is altered, however, septa are present even in the elongated cells, and therefore we assume that the *spo0M* null mutation affects the cell after the first stages of septum establishment. This result suggests that the Δ 0M mutant cells, despite exhibiting correct septum formation, might have a reduced efficiency for septum positioning or constriction, a phenotype previously reported in *ftsA* mutants [8,51].

In the referenced *ftsA* mutants, the Z ring was well positioned, but its interaction with the cell membrane was not effective and constriction was impeded, and cell division was blocked [8,10]. We therefore hypothesize that Spo0M is involved in the cell division process during the vegetative growth of *Bacillus subtilis*, which opens new possibilities for the functional study of this protein.

Intracellular localization of SpoM is dependent on the bacterial life cycle

The expression and localization patterns of diverse proteins within a cell determine cell fate during differentiation. For example, after the onset of sporulation, the activation of different sigma factors in the mother cell and in the forespore regulates subsequent processes in each cell compartment by modulating the expression of specific proteins. To analyze the relationship between Spo0M function and its intracellular localization, we generated a

Spo0M:DsRed fusion protein using the plasmid pSGGS (S2 Table) (Fig 4A). The translational fusion was integrated by homologous recombination in the Δ 0M mutant strains (in the genetic background of the SCK6 and FG347strains), using 500 bp in the 5' region of *spo0M* and 500 bp of the 3' end of the kanamycine resistance cassette. We validated the chromosomal integration of the fusion gene construct using PCR (S3A and S3B Figs) and sequencing. The introduction of the Spo0M:DsRed construction did not cause any variation in the growth rate of the analyzed strains either in rich or sporulation media (S3C and S3D Figs). We also validated that the *spo0M::DsRed* gene fusion restored the wild type phenotype of the *B. subtilis* Δ 0M strain by observation of bacterial morphology (Fig 4B) and by quantifying sporulation (Fig 4C). Cell morphology and cell length were restored in both strains containing the Spo0M:DsRed construction (Fig 4B). As mentioned previously, the average length of the wild type SCK6 cells was $2.85 \pm 0.95 \mu\text{m}$, whereas the average length of the Δ 0M cells was $11.10 \pm 5.16 \mu\text{m}$. The cell length distribution of the Spo0M:DsRed cells was similar to that of the wild type cells, with a mean value of $2.58 \pm 0.94 \mu\text{m}$ (N=249), and it was significantly different than the cell length distribution of the mutant strain; we performed a multiple comparison test between each strain with a significance *p value* of 0.001 (S4 Fig). The sporulation efficiency of the Spo0M:DsRed strain was also nearly identical to that of the wild type strain (Fig 4C). Finally, we evaluated spore resistance to wet heat and chemical treatment in the strains containing the fusion protein. These results show that the spores generated by the Spo0M:DsRed strain had similar levels of resistance as those generated by the wild type strain (S3E Fig) and that the Spo0M:DsRed fusion protein complements the mutant phenotype. The reversion of the elongated phenotype supports the hypothesis that Spo0M is involved in the vegetative stage of growth of *B. subtilis* and possibly at the cell division process.

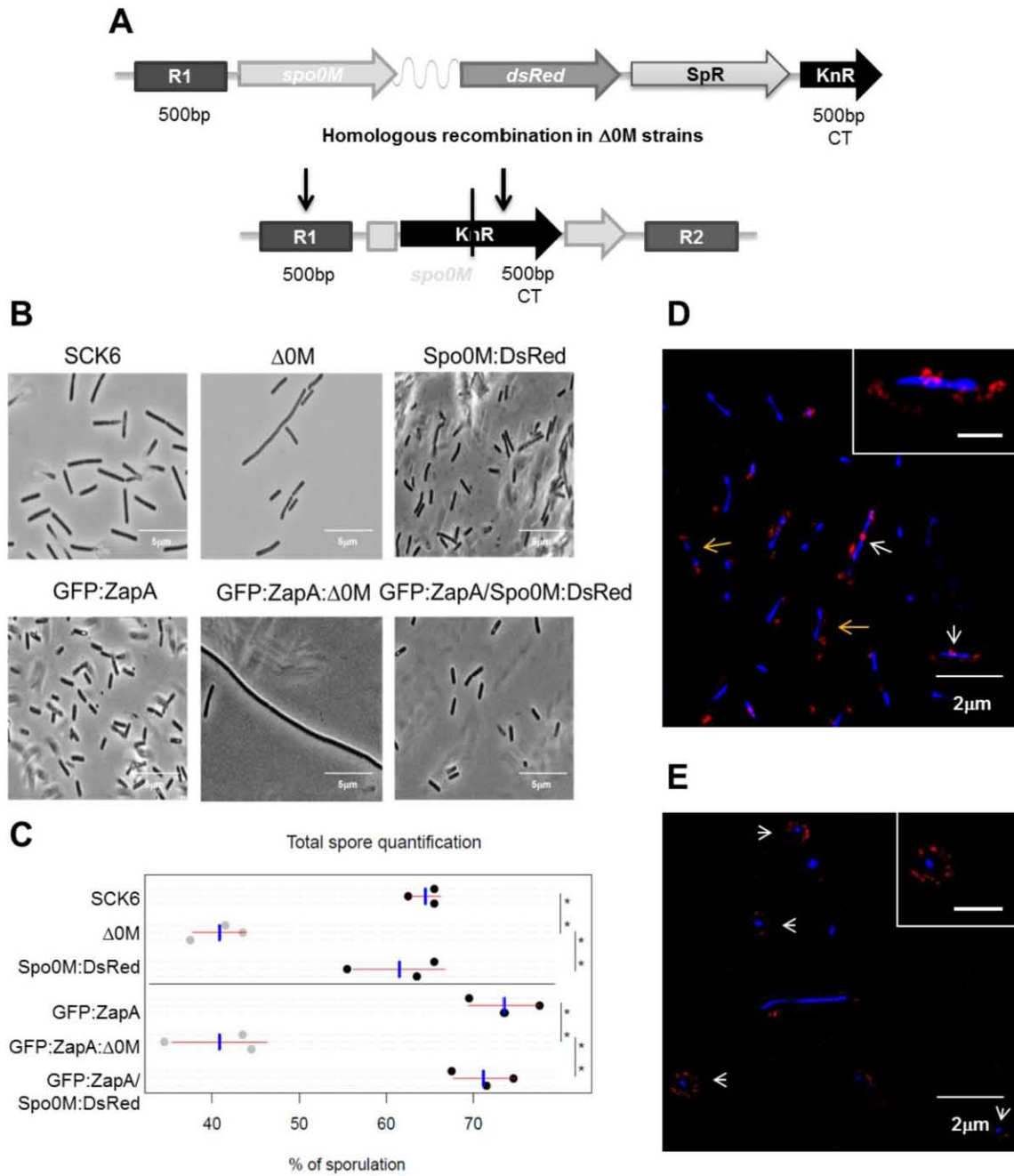
Fig 4. Spo0M exhibits a scattered distribution pattern in cells, appearing near the cell poles and the septum region. We generated a Spo0M:DsRed fusion protein via allelic replacement using the pSGGS construct (A) (see S1_File). R1, 500 bp upstream of the 5' intergenic region of *spo0M*; SpR, spectinomycin resistance cassette; KnR, 500 bp of the CT region of a kanamycin resistance cassette. B. We analyzed the phenotypes of these strains

using light microscopy and observed that the wild type phenotype was restored. The absence of elongated cells in the Spo0M:DsRed strains indicated that Spo0M functionality was complemented by the fusion protein C. Spore quantification of the wild type, mutant and Spo0M:DsRed strains. All of the strains were cultured in Spizizen sporulation medium for 40 h. The total number of spores in each sample was quantified manually using a bright field microscope. The number of spores generated by the Spo0M:DsRed strain was restored to wild type levels, validating that the Spo0M phenotype was complemented with the fusion protein. Data was analyzed through an ANOVA test and a Turkey multiple analysis of means, with a *p* value of 0.001, blue bar corresponds to the mean value and red bar represents the standard deviation. We used the fluorescent fusion protein to analyze the localization pattern of Spo0M during bacterial growth in rich and sporulation media. **D.** In rich medium (exponential phase of growth, 6-8 h of culture), Spo0M formed a scattered distribution near the cell poles (orange arrows) and in the central region of the cell, where a septum would be expected to form (white arrow). This distribution pattern remained until the appearance of the first spores (20-24 h). **E.** In sporulation medium (16-20 h of culture), Spo0M was localized to the forespores (arrow head), and it remained contained in these structures even after their release as mature spores (after 18-20 h). Scale bar inside the box is 1 μ m.

Using confocal and super-resolution microscopy, we analyzed Spo0M localization in bacteria grown in both rich and sporulation media over a 24 h period (S5A and S5B Figs). Bacterial culture in rich medium allowed us to assess Spo0M expression patterns during vegetative growth, while bacterial culture in sporulation medium facilitated the observation of cells during differentiation. We found that Spo0M:DsRed could be located throughout the cell periphery during vegetative growth, but with a tendency to accumulate near the cell poles and the central region of the cell (31% of the signal was present at the poles of the cells, and 37% of the signal was present in the central region; N=456) (Fig 4D and S2 Video). The same distribution pattern was observed in the early stages of culture in both media and remained until the first spores appeared (24 h of culture in rich medium and 6-8 h of culture in sporulation medium). Upon the initiation of sporulation, Spo0M:DsRed accumulated in the forespore, and its concentration increased as spore maturation

progressed (Fig 4E). Once the mature spore was released, after the lysis of the mother cell, a strong Spo0M:DsRed signal was still detectable.

Fig 4.



The above results suggest that Spo0M localization depends on cell fate and might be related to Spo0M's cellular functions. During vegetative growth, Spo0M is localized to the middle of the cell and at the cell poles, suggesting its involvement in a function other than sporulation control. This localization pattern supports our hypothesis that Spo0M might have a functional role during the vegetative stage growth, and in conjunction with all the observed results, suggests that Spo0M might be involved in cell division. During sporulation Spo0M accumulates in the spore until the spore matures and is released, suggesting that this protein acts not only at the beginning of the process. Several proteins involved in early stages of sporulation are later degraded by proteases when their function is no longer needed, as it happens with the sigma factors specific for each compartment [52,53] whereas, the proteins that remain in the spore are generally required for later stages or even for germination [54]. The presence of Spo0M in the spores suggests an additional function for this protein at later stages of sporulation.

Spo0M is expressed in cells at early stages of vegetative growth

Analysis of Spo0M localization revealed detectable Spo0M:DsRed signals in cells at very early stages of growth, around the second hour of culture (S5A and S5B Figs). According to previous reports, *spo0M* transcription initiates from either a sigma factor σ^H or σ^W promoter [3,5,7]. The σ^H promoter is known to be expressed during the transition between the exponential phase of growth to the stationary phase [55], but it is also known that σ^H is an active vegetative sigma factor [56–58]; for example, it regulates the transcription of *ftsA* or *citGP2*, which are part of the SigmaH regulon and whose main transcription during the vegetative stage of growth is directed by this sigma factor [57,58].

Additionally, we determined that the promoter region of *spo0M* contains a predicted binding site for the housekeeping sigma factor σ^A (see Material and methods) (S6 Fig). The phenomenon of double regulation during the start of transcription has been previously observed in genes involved in sporulation, such as *spoVG*, which possesses two overlapping regulation sites, one a σ^H promoter and the other a regulatory binding site for AbrB [59], with both controlling expression during vegetative growth. It would be interesting to determine if *spo0M* is regulated via a similar mechanism.

To determine whether the observed fluorescent signal corresponded to the expression of Spo0M:DsRed, we further analyzed the expression of the fusion protein by Western blotting. The molecular weight of Spo0M is reported to be 28 kDa [3], which is close to the molecular weight of DsRed. Therefore, the molecular weight of the fusion protein is expected to be approximately 56 kDa. Our results showed that Spo0M:DsRed expression is detected from the first 2-4 h in culture in both rich and sporulation media. This expression stabilized around the tenth hour and essentially plateaued until the 22nd hour (S5C and S5D Figs). This pattern is concordant with the results from microscopic analysis, in which the Spo0M:DsRed fusion protein was detected from early stages of growth in both media. These results reinforce the hypothesis that Spo0M is functional during the vegetative lifecycle of *B. subtilis*.

Spo0M interacts with proteins involved in sporulation, signaling and cell division

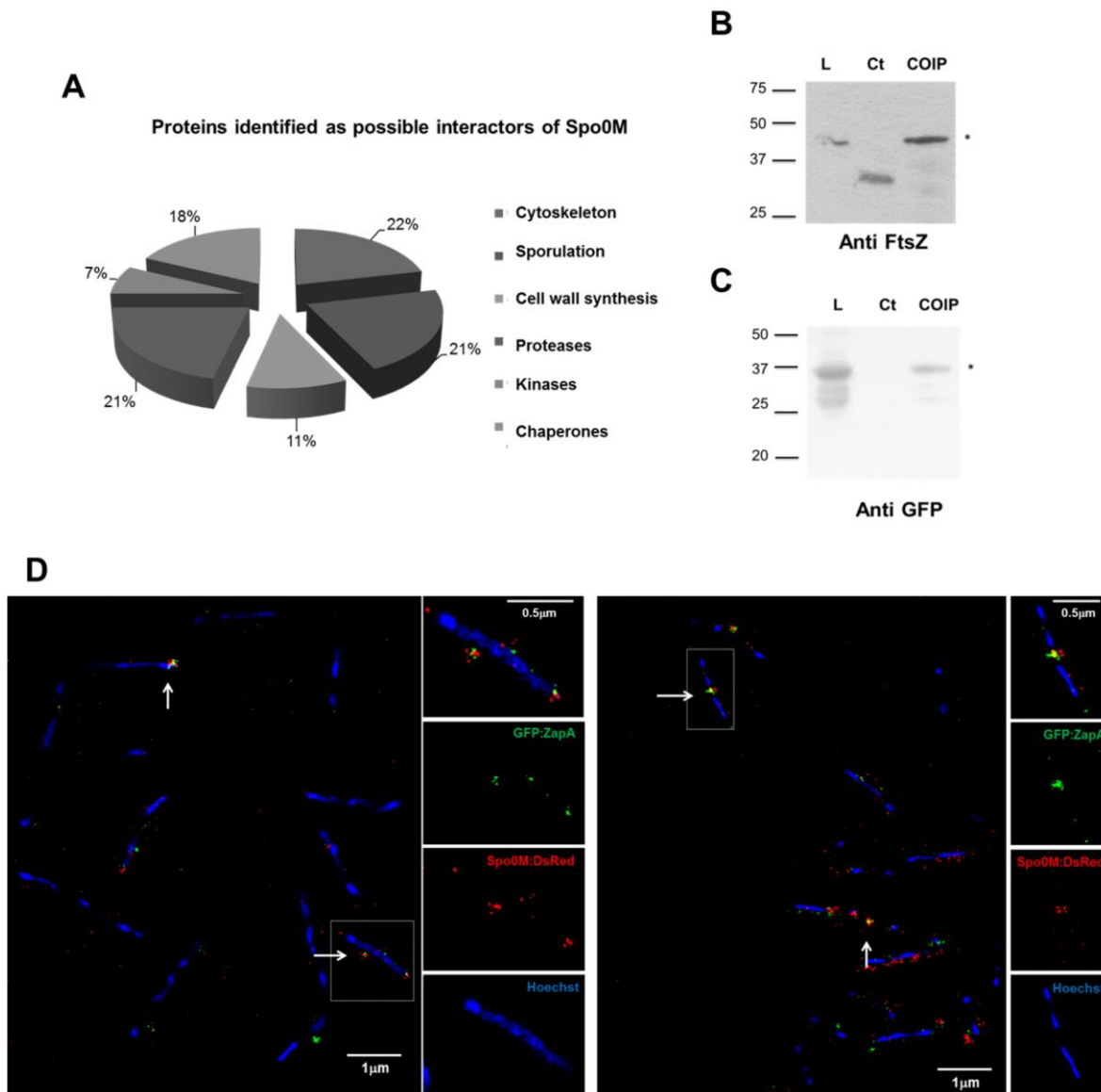
Our next aim was to identify possible Spo0M interactors in *B. subtilis*. To accomplish this, we generated a FLAG-tagged Spo0M protein (Spo0M-FLAG) for use in immunoprecipitation assays performed using FLAG antibody-coupled agarose beads. We mixed cell extracts from the BL21-DE3 *E. coli* strain that had been induced with IPTG to express Spo0M-FLAG with cell extracts from the wild type *B. subtilis* 1A1 (Bs1A1) strain. As a control, we repeated the same experiment using the BL21-DE3 *E. coli* strain containing an empty FLAG vector. We loaded both samples onto an SDS-PAGE gel and then identified the proteins that appeared in the Spo0M-FLAG sample that differed from those in the control sample (S7 Fig). We obtained three biological replicates for this experiment. Selected bands were excised from the gel and digested, and the resultant peptides were analyzed by mass spectrometry.

As a result of this analysis, we identified proteases, kinases, chaperones, proteins involved in sporulation, cell division and cell wall synthesis (Fig 5A and S1 Table). Proteases, kinases and chaperones are common and often promiscuous components of protein interaction networks, however, it is remarkable that we found proteins that might be involved in sporulation, such as the ClpC/Clp-P protease system [60], PepF [61], Hrp kinase [62]. Meanwhile, the FtsH metalloprotease, involved in cell division [63],

sporulation and biofilm formation [64,65], and as the only previously reported protein to interact with Spo0M [4] can be considered as an internal control for this experiment. In addition to the above mentioned proteins, in our immunoprecipitation experiment we also identified the chaperones GroEL, DnaK and trigger factor, which have been shown to generate filamentation when mutated in *E. coli* [66–68]. Further, it is known that DnaK directly interacts with FtsZ [67] and it has been reported that the lack of trigger factor in *B. subtilis* causes a delay in sporulation and germination [54].

Fig 5. Spo0M interacting proteins are involved in sporulation, signaling and cell division. **A.** Pie chart showing the distribution of the identified proteins classified according to their functionality. We identified possible interaction partners of Spo0M by mass spectrometry analysis, using a FLAG-tagged empty vector as a control. **B.** Spo0M co-immunoprecipitates with FtsZ, indicating that it forms part of the same molecular complex. **C.** Spo0M also co-immunoprecipitates with GFP:ZapA, validating the interaction of Spo0M with some of the cell division proteins. Total protein extracts from a Spo0M:DsRed or an induced GFP:ZapZ/Spo0M:DsRed strains were allowed to interact with commercial anti-DsRed antibody and a protein A – sepharose column. FtsZ or GFP:ZapA precipitation was revealed by Western blotting using commercial anti-FtsZ or anti-GFP antibodies. As a control (Ct), we used the protein A – sepharose column with the total extract of protein mentioned above and an un-specific anti-IG antibody. L. Total extract of protein used in each experiment. **D.** Spo0M co-localizes with the cell division protein ZapA. Cells from the strain GFP:ZapA/Spo0M:DsRed were cultured in rich medium until the exponential phase (OD_{600} 0.4-0.6) and GFP:ZapA fluorescent fusion expression was induced with 0.1% xylose during 4h. DNA was stained with 0.01 mg mL^{-1} Hoechst (final concentration). The fusion proteins Spo0M:DsRed and GFP:ZapA co-localize in the medial region of the cell and near the cell poles (white arrows), corroborating that Spo0M interacts with a molecular complex of proteins involved in cell division.

Fig 5.



Among the sporulation-related proteins that were enriched in our immunoprecipitation assay we encountered the master regulator Spo0A, whose expression levels fall when cells lack Spo0M [3]. However, it is not known whether the Spo0A-Spo0M interaction is direct, nor how Spo0M interferes with its expression. In addition to Spo0A, we also found proteins involved in later stages of sporulation, such as engulfment, coat and cortex assembly and germination (S1 Table). These results are in accordance with the results of the spore resistance tests reported in this work, which showed that the spores

generated by the $\Delta 0M$ strain are less resistant than those of the wild type strain and suggest an involvement of Spo0M at advanced stages of the differentiation process. Spo0M would not be the first example of a protein involved in more than one stage of sporulation; prior reports of similar behavior exist for the SpoIIE and SpoIIIE proteins. SpoIIE is a phosphatase essential for polar localization of the Z ring during asymmetrical division, where it associates with FtsZ [19]. After forespore formation, SpoIIE re-localizes to the internal side of the forespore membrane where it activates σ^F , the first sigma factor specific to this structure, by releasing it from the SpoIIAB interaction [52]. On the other hand, SpoIIIE is a DNA translocase involved in DNA segregation during sporulation and some special cases of mid – division [69]; it also participates in the recombination process during dimer resolution in segregation, in a collaborative function with SftA [20,69]; and finally, it is involved in membrane fusion during engulfment [70]. Another example of a multi-functional protein is SpoVG. Mutants in *spovG* show impairment in asymmetrical division [71] and additionally, it is required for cortex synthesis [72]. If confirmed, Spo0M would join a family of proteins that exhibit multiple functions in different *B. subtilis* physiological contexts.

As part of this interactome, we found proteins involved in cell division and membrane dynamics, such as FtsZ [73], DivIVA [19], EzrA [11], FtsA [8], SepF [10] and FloA [74], and cell wall synthesis machinery, such as PBP1 [75], PBP3, PBP4 [76] and FtsE [14]. Mutants in all the aforementioned proteins involved in cell division generate a filamentous phenotype, for example, mutants in *ftsA*, the main protein that tethers the Z ring to the membrane, are extremely filamentous during vegetative growth and also show a reduction in sporulation [51]. A similar pattern is observed for mutants of *sepF*, which is believed to share functional redundancy with FtsA [10]. Mutants in *ezrA*, the negative regulator of FtsZ polymerization, show filamentation and formation of “mini cells” [11,77]; anucleated “mini cells” are also generated by a mutation in *divIVA* [78]; finally, certain mutations in the C-terminal end of *ftsZ* produce filaments, possibly due to the loss of interaction with other proteins involved in cell division [79]. FloA is a membrane organizer, an element of the bacterial lipid rafts, for which absence leads to alterations in cell morphology, competence, biofilm formation and sporulation [74,80,81]. In a similar way, mutants in cell wall synthesis machinery show filamentation and defects in membrane

morphology similar to those reported for the *spo0M* null mutant in this current research [14,15,82]. Many of these factors have redundant functions in stabilizing the septum, promoting its constriction, or in regulating cell morphology and it is certain that there are still undiscovered elements that enable this machinery to function properly. The fact that the *spo0M* null mutation does not impair cell division or sporulation in its entirety, suggests that this protein has a redundant role with other bacterial protein(s) that precludes the development of more severe phenotypes.

The above results support the hypothesis for a role of Spo0M in the vegetative lifecycle of *B. subtilis*. According to this, we decided to corroborate the interaction of Spo0M with FtsZ, the main constituent of the Z ring and an essential element of this process, in both, mid-division and sporulation. For this assay, we mixed a total protein extract from the Spo0M:DsRed strain with an anti-DsRed antibody in a 1:100 ratio for 3h at 4 ° C. Next protein A coupled to sepharose beads was added to the mix and left to interact for 3h at 4 ° C. The beads were washed to eliminate non-interacting agents and were loaded onto an SDS-PAGE gel. We determined whether FtsZ coimmunoprecipitates with Spo0M:DsRed using Western blot analysis (Figs 5B and 5C). Our results showed that FtsZ is present in the same molecular complex as Spo0M:DsRed (Fig 5B), suggesting that Spo0M might be involved in cell division. We also performed the coimmunoprecipitation in the reverse order, wherein we mixed total protein extracts with a commercial anti-FtsZ antibody in a 1:100 ratio to purify FtsZ interactors using a protein A Sepharose column. As in the previous experiment, we separated the precipitated proteins by SDS-PAGE and determined whether Spo0M:DsRed coimmunoprecipitated with the FtsZ complex using an anti-DsRed antibody. The results corroborated the interaction between FtsZ and Spo0M (S8 Fig). To further validate the interaction of Spo0M with the molecular complex in which FtsZ is present during cell division, we evaluated the interaction of Spo0M with ZapA, another cell division protein that tethers FtsZ to the cell membrane and directly interacts with the Z ring [9]. We followed the same strategies described above for the coimmunoprecipitation assays with FtsZ, combining total protein extract from an induced GFP:ZapA/Spo0M:DsRed strain and an anti-GFP antibody. Although ZapA was not found as an enriched protein in the molecular complex coimmunoprecipitated with Spo0M, this might be explained due to its small size (9 kDa). In spite of this, we found that it does

interact with Spo0M (Fig 5C), corroborating that Spo0M interacts with a molecular complex of proteins involved in cell division.

Finally, we analyzed the co-localization of the fusion proteins Spo0M:DsRed and GFP:ZapA using super-resolution microscopy. As shown in Fig 5D, Spo0M:DsRed co-localized with GFP:ZapA at the poles and mid-region of the cell (S3 and S4 Videos). The interaction of Spo0M with FtsZ and ZapA supports our hypothesis on the role of this protein as a protein involved in the cell division process of *B. subtilis* at the vegetative stage of life of this bacterium.

Conclusions and future remarks

The present work provides unique insights supporting the hypothesis that Spo0M functions in cellular processes other than sporulation. Our results constitute the first evidence that Spo0M has a role in cell division during the vegetative growth stage. How does a *spo0M* mutation interfere with cell division? Do Spo0M-FtsZ and/or Spo0M-ZapA directly interact? Does this interaction occur during septum formation? Is this role in cell division also important during sporulation? Is Spo0M also participating in later stages of sporulation? There are still several open questions related to the functions of Spo0M in *B. subtilis*, however, the results presented here support the idea that Spo0M is not only a regulator of sporulation but also plays an important role during the vegetative growth of the bacterium. Our present efforts are currently focused on identifying proteins that interact with Spo0M, particularly those that are components of the bacterial cytoskeleton and membrane organizers. An improved understanding of the multifunctional role of Spo0M will allow a better understanding of the different cell processes in which Spo0M participate and how this processes are related.

Acknowledgments

We thank Dr. R. Losick's group for providing fluorescent septum reporters. We thank the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Dr. Arturo Pimentel, Dr. Juan García and M.C. Andrés Saralegui for their valuable help during image acquisition and analysis. We also thank Shirley Ainsworth for bibliographical assistance and Ricardo Ciria for computer

support. Adán Guerrero thank to DGTIC-UNAM for generous computing time on the Miztli super computer (SC15-1-IR-89; SC16-1-IR-102).

References

1. Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7: 579–586. doi:10.1016/j.mib.2004.10.001
2. Al-Hinai MA, Jones SW, Papoutsakis ET. The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015;79: 19–37. doi:10.1128/MMBR.00025-14
3. Han W-D, Kawamoto S, Hosoya Y, Fujita M, Sadaie Y, Suzuki K, et al. A novel sporulation-control gene (*spo0M*) of *Bacillus subtilis* with a σ^H -regulated promoter. *Gene*. 1998;217: 31–40. doi:10.1016/S0378-1119(98)00378-3
4. Thi Nguyen HB, Schumann W. The sporulation control gene *spo0M* of *Bacillus subtilis* is a target of the FtsH metalloprotease. *Res Microbiol*. Elsevier Masson SAS; 2012;163: 114–8. doi:10.1016/j.resmic.2011.10.011
5. Zweers JC, Nicolas P, Wiegert T, van Dijl JM, Denham EL. Definition of the σ^W Regulon of *Bacillus subtilis* in the Absence of Stress. *PLoS One*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0048471
6. Arrieta-Ortiz ML, Hafemeister C, Bate AR, Chu T, Greenfield A, Shuster B, et al. An experimentally supported model of the *Bacillus subtilis* global transcriptional regulatory network. *Mol Syst Biol*. 2015;11: 839. doi:10.15252/msb.20156236
7. Britton R a, Eichenberger P, Eduardo J, Fawcett P, Monson R, Grossman AD, et al. Genome-Wide Analysis of the Stationary-Phase Sigma Factor (σ^H) Regulon of *Bacillus subtilis* Genome-Wide Analysis of the Stationary-Phase Sigma Factor (σ^H) Regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 2002;184: 4881–4890. doi:10.1128/JB.184.17.4881
8. Pichoff S, Lutkenhaus J. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved

- membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol.* 2005;55: 1722–1734.
doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04522.x
9. Gueiros-Filho FJ, Losick R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* 2002;16: 2544–2556. doi:10.1101/gad.1014102
 10. Duman R, Ishikawa S, Celik I, Strahl H, Ogasawara N, Troc P, et al. Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110: E4601–E4610. doi:10.1073/pnas.1313978110
 11. Land AD, Luo Q, Levin PA. Functional domain analysis of the cell division inhibitor EzrA. *PLoS One.* 2014;9: e102616. doi:10.1371/journal.pone.0102616
 12. Adams DW, Wu LJ, Errington J. ScienceDirect Cell cycle regulation by the bacterial nucleoid. *Curr Opin Microbiol.* 2014;22: 94–101. doi:10.1016/j.mib.2014.09.020
 13. Ortiz C, Natale P, Cueto L, Vicente M. The keepers of the ring : regulators of FtsZ assembly. *FEMS Microbiol Rev.* 2015; 1–11. doi:10.1093/femsre/fuv040
 14. Garti-Levi S, Hazan R, Kain J, Fujita M, Ben-Yehuda S. The FtsEX ABC transporter directs cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2008;69: 1018–28. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06340.x
 15. Wei Y, Havasy T, McPherson DC, Popham DL. Rod shape determination by the *Bacillus subtilis* class B penicillin-binding proteins encoded by *pbpA* and *pbpH*. *J Bacteriol.* 2003;185: 4717–26. doi:10.1128/JB.185.16.4717
 16. Graumann PL. Cytoskeletal Elements in Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61: 589–618. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093236
 17. Adams DW, Errington J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2009;7: 642–653. doi:10.1038/nrmicro2198
 18. Lutkenhaus J, Pichoff S, Du S. Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome.

Cytoskeleton. 2012;69: 778–790. doi:10.1002/cm.21054

19. Eswaramoorthy P, Winter PW, Wawrzusin P, York AG, Shroff H, Ramamurthi KS. Asymmetric Division and Differential Gene Expression during a Bacterial Developmental Program Requires DivIVA. *PLoS Genet.* 2014;10. doi:10.1371/journal.pgen.1004526
20. Fiche J-B, Cattoni DI, Diekmann N, Langerak JM, Clerte C, Royer C a, et al. Recruitment, assembly, and molecular architecture of the SpoIIIE DNA pump revealed by superresolution microscopy. *PLoS Biol.* 2013;11: e1001557. doi:10.1371/journal.pbio.1001557
21. Errington J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol.* 2003;1: 117–126. doi:10.1038/nrmicro750
22. Burkholder PR, Giles NH. Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am J Bot.* 1947;34: 345–348. doi:10.2307/2437147
23. Youngman P, Perkins JB, Losick R. Construction of a cloning site near one end of Tn917 into which foreign DNA may be inserted without affecting transposition in *Bacillus subtilis* or expression of the transposon-borne *erm* gene. *Plasmid.* 1984;12: 1–9. doi:10.1016/0147-619X(84)90061-1
24. Zhang XZ, Zhang YHP. Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*. *Microb Biotechnol.* 2011;4: 98–105. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00230.x
25. Wilson G a., Bott KF. Nutritional Factors Influencing the Development of Competence in the *Bacillus subtilis* Transformation System. *J Bacteriol.* 1968;95: 1439–1449. doi:papers2://publication/uuid/C1DE59AE-2BEE-45B0-B582-9F9AE6AFA47D
26. Wach A. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast.* 1996;12: 259–265. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19960315)12:3<259::AID-YEA901>3.0.CO;2-C

27. Sambrook J FE MT. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, editor. N.Y.: Cold Spring Harbor; 1989. doi:10.1016/0307-4412(83)90068-7
28. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1951;62: 293–300. doi:citeulike-article-id:149214
29. Anagnostopoulos C, Spizizen J. Requirements for Transformation in *Bacillus Subtilis*. *J Bacteriol.* 1961;81: 741–6. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=279084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Nicholson, W.L., and Setlow P. Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood CR and CSM, editor. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Chichester: John Wiley & Sons; 1990. pp. 391–450.
31. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9: 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019
32. Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, Owen DM, Pereira PM, Henriques R. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nat Commun.* 2016;7: 1–9. doi:10.1038/ncomms12471
33. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227: 680–685. doi:10.1038/227680a0
34. Searle BC. Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics.* 2010;10: 1265–1269. doi:10.1002/pmic.200900437
35. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: D457–D462. doi:10.1093/nar/gkv1070
36. Stothard P, Van Domselaar G, Shrivastava S, Guo A, O’Neill B, Cruz J, et al. BacMap: An interactive picture atlas of annotated bacterial genomes. *Nucleic Acids*

Res. 2005;33. doi:10.1093/nar/gki075

37. De Hoon MJL, Eichenberger P, Vitkup D. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr Biol.* 2010;20. doi:10.1016/j.cub.2010.06.031
38. Girard G, Traag BA, Sangal V, Mascini N, Hoskisson PA, Goodfellow M, et al. A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. *Open Biol.* 2013;3: 130073. doi:10.1098/rsob.130073
39. Ohnishi Y, Seo JW, Horinouchi S. Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;216: 1–7. doi:10.1016/S0378-1097(02)00996-5
40. Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* (80-). 2006;311: 1283–1287. doi:10.1126/science.1123061
41. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32: 1792–1797.
42. Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences. Univ Washingt Seattle. 2005; Distributed by the author. Department of Genome Sc.
43. Zhang J, Nei M. Accuracies of ancestral amino acid sequences inferred by the parsimony, likelihood, and distance methods. *J Mol Evol.* 1997;44. doi:10.1007/PL00000067
44. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics.* 2007;23: 127–128. doi:10.1093/bioinformatics/btl529
45. Taboada B, Ciria R, Martinez-Guerrero CE, Merino E. ProOpDB: Prokaryotic operon database. *Nucleic Acids Res.* 2012;40. doi:10.1093/nar/gkr1020
46. Martinez-Guerrero CE, Ciria R, Abreu-Goodger C, Moreno-Hagelsieb G, Merino E. GeConT 2: gene context analysis for orthologous proteins, conserved domains and

- metabolic pathways. *Nucleic Acids Res.* 2008;36. doi:10.1093/nar/gkn330
47. Mulligan ME, Hawley DK, Entriken R, McClure WR. *Escherichia coli* promoter sequences predict in vitro RNA polymerase selectivity. *Nucleic Acids Res.* 1984;12: 789–800. doi:PMC321093
 48. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* 2004;14: 1188–1190. doi:10.1101/gr.849004
 49. Driks A, Eichenberger P. The Spore Coat. *ASMscience.* 2016;4. doi:10.1128/microbiolspec.TBS
 50. McKenney PT, Eichenberger P. Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2012;83: 245–60. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07936.x
 51. Beall B, Lutkenhaus J. Impaired cell division and sporulation of a *Bacillus subtilis* strain with the *ftsA* gene deleted. *J Bacteriol.* 1992;174: 2398–2403. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1551857<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205866/pdf/jbacter00073-0356.pdf>
 52. King N, Dreesen O, Stragier P, Pogliano K, Losick R. Septation, dephosphorylation, and the activation of sigma(F) during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 1999; 1156–1167.
 53. Msadek T, Dartois V, Kunst F, Herbaud ML, Denizot F, Rapoport G. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol.* 1998;27: 899–914. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00735.x
 54. Sinai L, Rosenberg A, Smith Y, Segev E, Ben-Yehuda S. The Molecular Timeline of a Reviving Bacterial Spore. *Mol Cell.* 2015;57: 695–707. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.019
 55. Healy J, Weir J, Smith I, Losick R. Post-transcriptional control of a sporulation regulatory gene encoding transcription factor sHin *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.*

- 1991;5: 477–487.
56. Carter HL, Wang LF, Doi RH, Moran CP. *rpoD* operon promoter used by sigma H-RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1988;170: 1617–1621.
 57. Price VA, Feavers IM, Moir A. Role of sigma H in expression of the fumarase gene (*citG*) in vegetative cells of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol.* 1989;171: 5933–5939.
 58. Patrick S, Gonzy-treboul G. Developmental Regulation of Transcription sub *tilis* *ftsAZ* Operon of the *Bacillus*. *Dna Seq.* 1992;224: 967–979.
 59. Zuber P, Losick R. Role of *AbrB* in *Spo0A*- and *Spo0B*-dependent utilization of a sporulation promoter in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1987;169: 2223–2230.
 60. Turgay K, Persuh M, Hahn J, Dubnau D. Roles of the two *ClpC* *atp* binding sites in the regulation of competence and the stress response. *Mol Microbiol.* 2001;42: 717–727. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02623.x
 61. Kanamaru K, Stephenson S, Perego M. Overexpression of the *PepF* oligopeptidase inhibits sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2002;184: 43–50. doi:10.1128/JB.184.1.43
 62. Pompeo F, Foulquier E, Galinier A. Impact of Serine/Threonine Protein Kinases on the Regulation of Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol.* 2016;7: 1–7. doi:10.3389/fmicb.2016.00568
 63. Wehrl W, Niederweis M, Schumann W. The *FtsH* protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. *J Bacteriol.* 2000;182: 3870–3873. doi:Doi 10.1128/Jb.182.13.3870-3873.2000
 64. Kotschwar M, Harfst E, Ohanjan T, Schumann W. Construction and analyses of mutant *ftsH* alleles of *Bacillus subtilis* involving the *ATPase*- and *Zn*-binding domains. *Curr Microbiol.* 2004;49: 180–5. doi:10.1007/s00284-004-4319-2
 65. Le ATT, Schumann W. The *Spo0E* phosphatase of *Bacillus subtilis* is a substrate of the *FtsH* metalloprotease. *Microbiology.* 2009;155: 1122–32.

doi:10.1099/mic.0.024182-0

66. Castanié-Cornet MP, Bruel N, Genevaux P. Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *BBA - Mol Cell Res.* The Authors; 2014;1843: 1442–1456. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.11.007
67. Sugimoto S, Saruwatari K, Higashi C, Sonomoto K. The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system and for cell division. *Microbiology.* 2008;154: 1876–85. doi:10.1099/mic.0.2008/017376-0
68. Guthrie B, Wickner W. Trigger factor depletion or overproduction causes defective cell division but does not block protein export. *J Bacteriol.* 1990;172: 5555–5562.
69. Crozat E, Rousseau P, Fournes F, Cornet F. The FtsK Family of DNA translocases finds the ends of circles. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2014;24: 396–408. doi:10.1159/000369213
70. Sharp MD, Pogliano K. The membrane domain of SpoIIIE is required for membrane fusion during *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol.* 2003;185: 2005–2008. doi:10.1128/JB.185.6.2005-2008.2003
71. Matsuno K, Sonenshein AL. Role of SpoVG in asymmetric septation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1999;181: 3392–3401.
72. Rosenbluh A, Banner CDB, Losick R, Fitz-James PC. Identification of a new developmental locus in *Bacillus subtilis* by construction of a deletion mutation in a cloned gene under sporulation control. *J Bacteriol.* 1981;148: 341–351.
73. Erickson HP. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell.* 1995;80: 367–370. doi:10.1016/0092-8674(95)90486-7
74. Dempwolff F, Möller HM, Graumann PL. Synthetic motility and cell shape defects associated with deletions of flotillin/reggie paralogs in *Bacillus subtilis* and interplay of these proteins with NfeD proteins. *J Bacteriol.* 2012;194: 4652–4661. doi:10.1128/JB.00910-12

75. Foulquier E, Pompeo F, Bernadac A, Espinosa L, Galinier A. The YvcK protein is required for morphogenesis via localization of PBP1 under gluconeogenic growth conditions in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2011;80: 309–18. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07587.x
76. Scheffers DJ, Jones LJF, Errington J. Several distinct localization patterns for penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2004;51: 749–764. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03854.x
77. Kawai Y, Ogasawara N. *Bacillus subtilis* EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. *Microbiology.* 2006;152: 1129–41. doi:10.1099/mic.0.28497-0
78. Eswaramoorthy P, Erb ML, Gregory JA, Silverman J, Pogliano K, Pogliano J, et al. Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. *MBio.* 2011;2. doi:10.1128/mBio.00257-11
79. Feucht A, Errington J. *ftsZ* mutations affecting cell division frequency, placement and morphology in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 2005;151: 2053–2064. doi:10.1099/mic.0.27899-0
80. Yepes A, Schneider J, Mielich B, Koch G, García-Betancur J-C, Ramamurthi KS, et al. The biofilm formation defect of a *Bacillus subtilis* flotillin-defective mutant involves the protease FtsH. *Mol Microbiol.* 2012;86: 457–71. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08205.x
81. Mielich-Süss B, Schneider J, Lopez D. Overproduction of flotillin influences cell differentiation and shape in *Bacillus subtilis*. *MBio.* 2013;4: e00719-13. doi:10.1128/mBio.00719-13
82. Szwedziak P, Löwe J. Do the divisome and elongasome share a common evolutionary past? *Curr Opin Microbiol.* 2013;16: 745–751. doi:10.1016/j.mib.2013.09.003
83. Camacho a, Salas M. Effect of mutations in the “extended -10” motif of three

Bacillus subtilis sigmaA-RNA polymerase-dependent promoters. *J Mol Biol.*
1999;286: 683–693. doi:10.1006/jmbi.1998.2526

Supporting information

S1 File. This file contains information of the plasmid construction methodology employed in this work and the list of the references mentioned in the Supporting Information section.

S1 Fig. Growth curves of the different strains used in this work. Growth curves for the different strains used in this work, listed in S2 Table, were determined in rich (A) and sporulation media (B). There were no significant differences in the growth rates of any of the strains in either rich or minimal media. The error bars represent standard deviations.

S2 Fig. DNA fibers appear decondensed in the *spo0M* null mutant compared to the wild type strain. Using the Fiji–ImageJ software [31], we measured the diameter of DNA fibers in wild type and mutant cells and we found that the diameter of the DNA fibers present in the mutant cells is significantly longer than the one found in wild type cells. Data was analyzed by a Student’s T test of 2 tails assuming equal variances, the significance *p* value was 4.57 E-38; error bars represent the standard deviation.

S3 Fig. Generation of the Spo0M-DsRed fluorescent fusion protein and localization of the protein over 24 h. A. and B. PCR amplification of DNA fragments for verification of the generation of the Spo0M-DsRed fusion strain in the SCK6 and FG347 genetic backgrounds. Chromosomal DNA was used for PCR amplification of genes. The following strains were used: A. SCK6/FG347, B. $\Delta 0M$ /GFP:ZapA: $\Delta 0M$, C. Spo0M:DsRed/GFP:ZapA/Spo0M:DsRed, and D. BsA1A. The expected gene sizes were *spo0M*, 950 bp; $\Delta 0M$, 1800 bp; *amyE*, 2100 bp; *amyE:gfp:zapA*, 4000 bp; and *dsRed*, 700 bp. Growth curves of the Spo0M:DsRed strains in rich (C) and minimal media (D). There were no significant differences in the growth rates of the analyzed strains in either rich or minimal media. The error bars represent standard deviations. E. Analysis of spore resistance in wild type, mutant and Spo0M:DsRed strains. The analysis was conducted as described in Materials and methods. The results show that the spores generated by the strain containing the fluorescent fusion protein have similar resistance to those generated by the wild type

strain, which demonstrate that Spo0M function is reestablished within the Spo0M:DsRed strain. Data was analyzed through an ANOVA test and a Turkey multiple analysis of means, with a *p value* of 0.001, blue bar corresponds to the mean value and red bar represents the standard deviation.

S4 Fig. Cell length distribution comparison between the wild type, Δ 0M and Spo0M:DsRed strains. Cell length was measured using the Fiji–ImageJ software [31]. The cell length distribution of the Spo0M:DsRed cells was similar to that of the wild type cells and it was significantly different than the cell length distribution of the mutant strain; we performed a multiple comparison test between each strain with a significance *p value* of 0.001.

S5 Fig. Spo0M is expressed from early stages of growth. We obtained samples of cells cultured and rich (A) or sporulation (B) media during 24h. Samples were taken each 2h; the cells were harvested and fixed with 4% PFA, then resuspended in 1X PBS and stained with the DNA marker DAPI at a final concentration of 0.01 mg mL⁻¹. The cells were observed by confocal microscopy. **A.** In rich medium, Spo0M:DsRed is observed in a scattered pattern near the cell poles and the middle of the cell; the signal remains until the first spores appear, then the signal is concentrated in the spores. **B.** In sporulation medium, Spo0M:DsRed is directed to the forespores and it remains as an intense signal even after the spore is released. We obtained total protein extracts from bacterial samples cultured in rich and sporulation media. Samples were taken every 2 h for 22 h, and the expression of Spo0M was analyzed by Western blotting using a commercial DsRed antibody. **C.** Spo0M expression was detected at early stages of growth in rich medium: a DsRed signal was detected from the second hour of culture and reached a maximum concentration around the 10th hour, remaining relatively constant until the 22nd hour. **D.** Similar results were obtained in sporulation medium, in which Spo0M expression was detected from the 4th hour of culture and then increased and remained constant until the 22th hour.

S6 Fig. *spo0M* orthologous genes have a consensus binding region for the vegetative stage sigma factor, σ^A . 5' intergenic sequences from *spo0M* orthologous genes were

obtained and used to search for potential binding sites of the housekeeping σ^A . The consensus sequence obtained was represented as a logo and corresponds with the σ^A promoter binding site sequence reported, 5'-TTGACA-17 nt-TATAAT-3' [83].

S7 Fig. Identification of the interaction elements of Spo0M in *B. subtilis*. A Spo0M-FLAG fusion protein was generated for the immunoprecipitation assays (see Material and methods). Cell extracts from the BL21-DE3 *E. coli* strain induced with IPTG to express Spo0M-FLAG were mixed with cell extracts of 8h, 10h and 12h culture of the Bs1A1 strain. The mixtures were made to interact with a column containing agarose beads coupled to an anti-FLAG antibody. As a control, we used the BL21-DE3 *E. coli* strain containing an empty FLAG vector. Problem and control samples were load onto an SDS-PAGE gel that was stained with Commassie Brilliant Blue and the differential bands in the problem samples with respect to the control were excised from the gel and digested; the resultant peptides were analyzed by mass spectrometry. The results represent the data of three biological replicates.

S8 Fig. Spo0M coimmunoprecipitates with FtsZ. Total protein extracts from a Spo0M:DsRed strain were allowed to interact with commercial anti-FtsZ antibody in a protein A – sepharose column. Spo0M:DsRed precipitation was revealed by Western blot using commercial anti-DsRed antibody. As a control (Ct), we used the protein A – sepharose column with the total extract of Spo0M:DsRed protein and a non-specific anti-IG antibody. L. Total lysate of proteins of the Spo0M:DsRed strain.

S1 Table. Possible interactors of Spo0M. We identified possible interaction partners of Spo0M by mass spectrometry analysis, using a FLAG-tagged empty vector as a control. The identified proteins are cited in this table, categorized by function.

S2 Table. Strains and plasmids used in this work.

S3 Table. Oligonucleotides used in this work.

S1 Video. Z stack animation of a *spo0M* null mutant cell. Cells from the GFP:ZapA: Δ 0M strain were cultured in rich medium until the exponential phase (OD_{600} 0.4-0.6) and fluorescent fusion expression was induced with 0.1% xylose during 4h. Cells were harvested and resuspended in PBS 1X; membranes were stained with 0.01 mg mL⁻¹ FM4-64 (final concentration) and DNA was stained with 0.01 mg mL⁻¹ Hoechst (final concentration). Samples were analyzed using super resolution microscopy (see Materials and methods). Ten Z stack images were obtained and recorded as an animation video to show the entire cell. Mutant cells appear as chains of bacilli of variable length, with some alterations in membrane morphology and DNA of decondensed appearance.

S2 Video. Z stack animation of a cell expressing Spo0M:DsRed. Cells from the Spo0M:DsRed strain were cultured in rich medium until the transition phase (OD_{600} 0.8-1.0). Cells were harvested and resuspended in PBS 1X and DNA was stained with 0.01 mg mL⁻¹ Hoechst (final concentration). Samples were analyzed using super resolution microscopy (see Materials and methods). Ten Z stack images were obtained and recorded as an animation video to show the entire distribution of the Spo0M:DsRed fusion protein within the cell. Spo0M:DsRed appears in a scattered pattern in all the cell periphery, but more prevalent at the poles and medial region of the cell.

S3 Video. Z stack animations of cells expressing the fluorescent fusions GFP:ZapA and Spo0M:DsRed. Cells from the GFP:ZapA/Spo0M:DsRed strain were cultured in rich medium until the exponential phase (OD_{600} 0.4-0.6) and GFP:ZapA fluorescent fusion expression was induced with 0.1% xylose during 4h. Cells were harvested and resuspended in PBS 1X and DNA was stained with 0.01 mg mL⁻¹ Hoechst (final concentration). Samples were analyzed using super resolution microscopy (See Materials and Methods). Ten Z stack images were obtained and recorded as an animation video to show the entire distribution of the fusion proteins within the cells. GFP:ZapA and Spo0M:DsRed proteins co-localize in the mid region of the cell.

S4 Video. Z stack animations of cells expressing the fluorescent fusions GFP:ZapA and Spo0M:DsRed. Cells from the GFP:ZapA/Spo0M:DsRed strain were cultured in rich medium until the exponential phase (OD_{600} 0.4-0.6) and GFP:ZapA fluorescent fusion expression was induced with 0.1% xylose during 4h. Cells were harvested and resuspended in PBS 1X and DNA was stained with 0.01 mg mL^{-1} Hoechst (final concentration). Samples were analyzed using super resolution microscopy (See Materials and Methods). Ten Z stack images were obtained and recorded as an animation video to show the entire distribution of the fusion proteins within the cells. GFP:ZapA and Spo0M:DsRed proteins co-localize in the cell poles.

Plasmid construction

All constructed plasmids were transformed into the DH5- α *E. coli* strain, after which they were transformed into the desired *B. subtilis* strain. The pUCm plasmid was constructed by deleting the *lacZ* and MCS regions from a pUC19 plasmid (D3404, Sigma-Aldrich) and replacing them with pUCmFw and pUCmRv oligonucleotides. These oligonucleotides contain restriction sites for PstI and BamHI restriction enzymes. To generate the pSpo0MFla plasmid, 500-bp regions flanking the *spo0M* gene were amplified by PCR using the above-described SpoFlaFw and SpoFlaRv oligonucleotides. The PCR product was cloned into the pUCm plasmid using the PstI and BamHI restriction sites. To construct the p Δ 0M plasmid, the *spo0m* gene in the pSpoFla plasmid was disrupted by insertion of a kanamycin resistance cassette using internal restriction sites for HindIII and SacI. The pSGGS plasmid was synthesized by GenScript (Piscataway Township, NJ, USA). The pT7-Spo0M-FLAG plasmid was generated by inserting a *spo0M* PCR product with no stop codon sequence, which was obtained using the SpoXIF and SpoKIIR oligonucleotides (containing restriction sites for XhoI and KpnI, respectively), into a pT7-MAT-FLAG vector (Sigma).

Supporting information references

1. Turgay K, Persuh M, Hahn J, Dubnau D. Roles of the two ClpC atp binding sites in the regulation of competence and the stress response. *Mol Microbiol.* 2001;42: 717–727. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02623.x
2. Msadek T, Dartois V, Kunst F, Herbaud ML, Denizot F, Rapoport G. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol.* 1998;27: 899–914. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00735.x
3. Kang MS, Kim SR, Kwack P, Lim BK, Ahn SW, Rho YM, et al. Molecular architecture of the ATP-dependent CodWX protease having an N-terminal serine active site. *Embo J.* 2003;22: 2893–2902. doi:10.1093/emboj/cdg289
4. Frees D, Savijoki K, Varmanen P, Ingmer H. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 2007;63: 1285–1295. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05598.x
5. Le ATT, Schumann W. The Spo0E phosphatase of *Bacillus subtilis* is a substrate of the FtsH metalloprotease. *Microbiology.* 2009;155: 1122–32. doi:10.1099/mic.0.024182-0
6. Prepiak P, Defrancesco M, Spadavecchia S, Mirouze N, Albano M, Persuh M, et al. MecA dampens transitions to spore, biofilm exopolysaccharide and competence expression by two different mechanisms. *Mol Microbiol.* 2011;80: 1014–1030. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07627.x
7. Thi Nguyen HB, Schumann W. The sporulation control gene spo0M of *Bacillus subtilis* is a target of the FtsH metalloprotease. *Res Microbiol. Elsevier Masson SAS;* 2012;163: 114–8. doi:10.1016/j.resmic.2011.10.011
8. Wehrl W, Niederweis M, Schumann W. The FtsH protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. *J Bacteriol.* 2000;182: 3870–3873. doi:Doi 10.1128/Jb.182.13.3870-3873.2000
9. Kanamaru K, Stephenson S, Perego M. Overexpression of the PepF oligopeptidase

inhibits sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2002;184: 43–50.
doi:10.1128/JB.184.1.43

10. Nessler S. The bacterial HPr kinase/phosphorylase: a new type of Ser/Thr kinase as antimicrobial target. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1754: 126–131. doi:S1570-9639(05)00304-3 [pii]r10.1016/j.bbapap.2005.07.042
11. Benson AK, Haldenwang WG. *Bacillus subtilis* sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90: 2330–4. Available:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Mogk A, Homuth G, Scholz C, Kim L, Schmid FX, Schumann W. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 1997;16: 4579–90. doi:10.1093/emboj/16.15.4579
13. Sugimoto S, Saruwatari K, Higashi C, Sonomoto K. The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system and for cell division. *Microbiology.* 2008;154: 1876–85.
doi:10.1099/mic.0.2008/017376-0
14. Castanié-Cornet MP, Bruel N, Genevaux P. Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *BBA - Mol Cell Res.* The Authors; 2014;1843: 1442–1456. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.11.007
15. Schulz A, Tzschaschel B, Schumann W. Isolation and analysis of mutants of the dnaK operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 1995;15: 421–429.
doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02256.x
16. Guthrie B, Wickner W. Trigger factor depletion or overproduction causes defective cell division but does not block protein export. *J Bacteriol.* 1990;172: 5555–5562.
17. Baram D, Pyetan E, Sittner A, Auerbach-Nevo T, Bashan A, Yonath A. Structure of trigger factor binding domain in biologically homologous complex with eubacterial

- ribosome reveals its chaperone action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102: 12017–12022. doi:10.1073/pnas.0505581102
18. Wahlstrom E. The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 2003;149: 569–577. doi:10.1099/mic.0.25511-0
 19. Hyyryläinen H-L, Marciniak BC, Dahncke K, Pietiäinen M, Courtin P, Vitikainen M, et al. Penicillin-binding protein folding is dependent on the PrsA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2010;77: 108–27. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07188.x
 20. Driks A, Eichenberger P. The Spore Coat. *ASMscience*. 2016;4. doi:10.1128/microbiolspec.TBS
 21. Yudkin MD, Harrison D. Effect of precisely identified mutations in the spoIIAC gene of *Bacillus subtilis* on the toxicity of the sigma-like gene product to *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*. 1987;209: 333–4. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3118147>
 22. McKenney PT, Eichenberger P. Dynamics of spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2012;83: 245–60. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07936.x
 23. Ozin AJ, Henriques AO, Yi H, Jr CPM. Morphogenetic Proteins SpoVID and SafA Form a Complex during Assembly of the *Bacillus subtilis* Spore Coat
Morphogenetic Proteins SpoVID and SafA Form a Complex during Assembly of the *Bacillus subtilis* Spore Coat. *J Bacteriol*. 2000;182: 1828–1833. doi:10.1128/JB.182.7.1828-1833.2000.Updated
 24. Steil L, Serrano M, Henriques AO, Völker U. Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 2005;151: 399–420. doi:10.1099/mic.0.27493-0
 25. Chen Y, Ray WK, Helm RF, Melville SB, Popham DL. Levels of germination proteins in *Bacillus subtilis* dormant, superdormant, and germinating spores. *PLoS*

One. 2014;9: :e95781. doi: 10.1371/journal.pone.0095781. eColle.
doi:10.1371/journal.pone.0095781

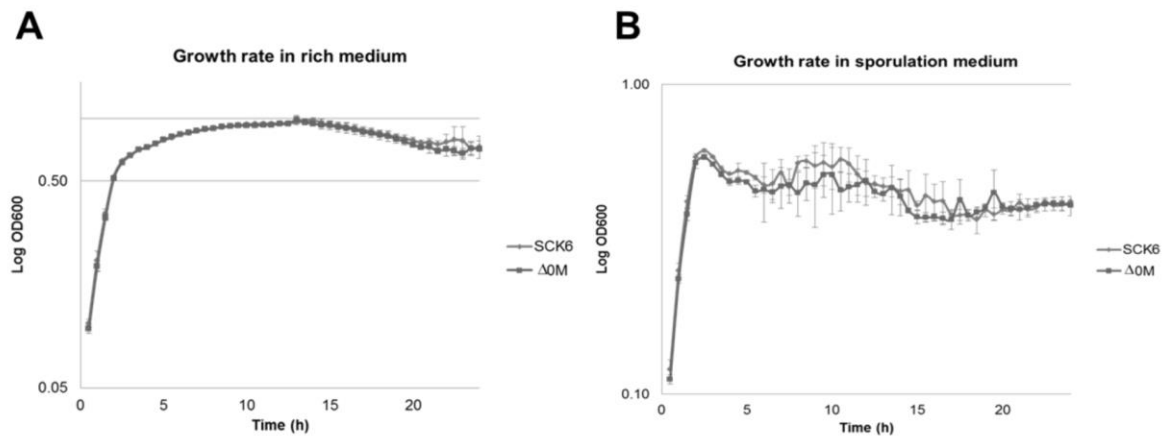
26. Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K. Localization of proteins to different layers and regions of *Bacillus subtilis* spore coats. *J Bacteriol.* 2010;192: 518–24. doi:10.1128/JB.01103-09
27. Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* 2004;7: 579–586. doi:10.1016/j.mib.2004.10.001
28. Beall B, Moran CP. Cloning and characterization of spoVR, a gene from *Bacillus subtilis* involved in spore cortex formation. *J Bacteriol.* 1994;176: 2003–2012. Available:
[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=205306&tool=pmcentrez
&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=205306&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
29. Scheffers DJ, Jones LJF, Errington J. Several distinct localization patterns for penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2004;51: 749–764. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03854.x
30. Foulquier E, Pompeo F, Bernadac A, Espinosa L, Galinier A. The YvcK protein is required for morphogenesis via localization of PBP1 under gluconeogenic growth conditions in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2011;80: 309–18. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07587.x
31. Erickson HP. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell.* 1995;80: 367–370. doi:10.1016/0092-8674(95)90486-7
32. Eswaramoorthy P, Erb ML, Gregory JA, Silverman J, Pogliano K, Pogliano J, et al. Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. *MBio.* 2011;2. doi:10.1128/mBio.00257-11
33. Land AD, Luo Q, Levin PA. Functional domain analysis of the cell division inhibitor EzrA. *PLoS One.* 2014;9: e102616. doi:10.1371/journal.pone.0102616
34. Pichoff S, Lutkenhaus J. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved

membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol.* 2005;55: 1722–1734.
doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04522.x

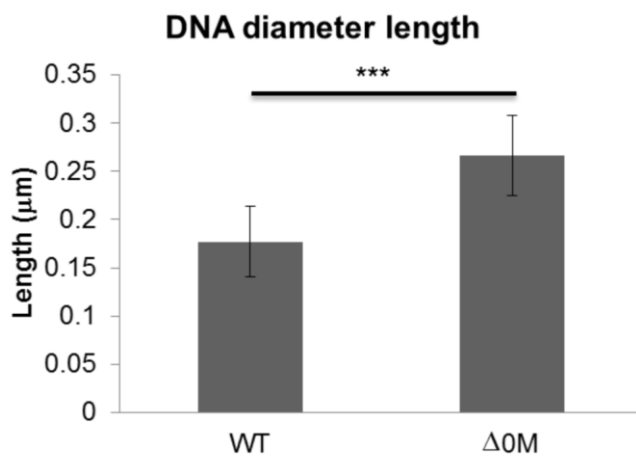
35. Beall B, Lutkenhaus J. Impaired cell division and sporulation of a *Bacillus subtilis* strain with the *ftsA* gene deleted. *J Bacteriol.* 1992;174: 2398–2403. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1551857<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2058666/pdf/jbacter00073-0356.pdf>
36. Jones LJF, Carballido-López R, Errington J. Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell.* 2001;104: 913–922.
doi:10.1016/S0092-8674(01)00287-2
37. Esue O, Cordero M, Wirtz D, Tseng Y. The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin. *J Biol Chem.* 2005;280: 2628–2635. doi:10.1074/jbc.M410298200
38. Duman R, Ishikawa S, Celik I, Strahl H, Ogasawara N, Troc P, et al. Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110: E4601–E4610. doi:10.1073/pnas.1313978110
39. Yepes A, Schneider J, Mielich B, Koch G, García-Betancur J-C, Ramamurthi KS, et al. The biofilm formation defect of a *Bacillus subtilis* flotillin-defective mutant involves the protease FtsH. *Mol Microbiol.* 2012;86: 457–71. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08205.x
40. Donovan C, Bramkamp M. Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiology.* 2009;155: 1786–1799.
doi:10.1099/mic.0.025312-0
41. Garti-Levi S, Hazan R, Kain J, Fujita M, Ben-Yehuda S. The FtsEX ABC transporter directs cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2008;69: 1018–28. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06340.x
42. Burkholder PR, Giles NH. Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *Am J Bot.* 1947;34: 345–348. doi:10.2307/2437147

43. Zhang XZ, Zhang YHP. Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*. *Microb Biotechnol.* 2011;4: 98–105. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00230.x
44. Gueiros-Filho FJ, Losick R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* 2002;16: 2544–2556. doi:10.1101/gad.1014102

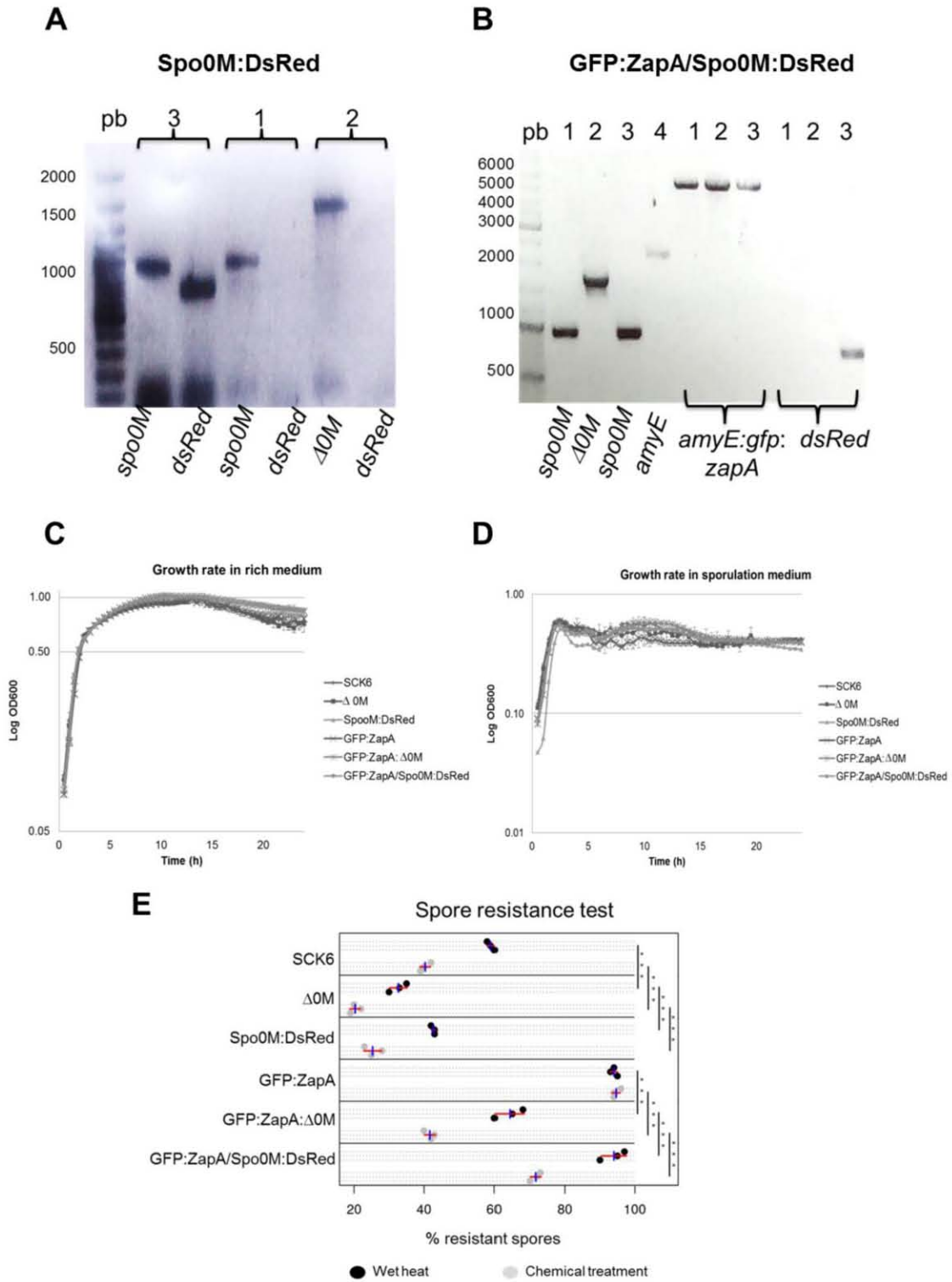
S1 Fig.



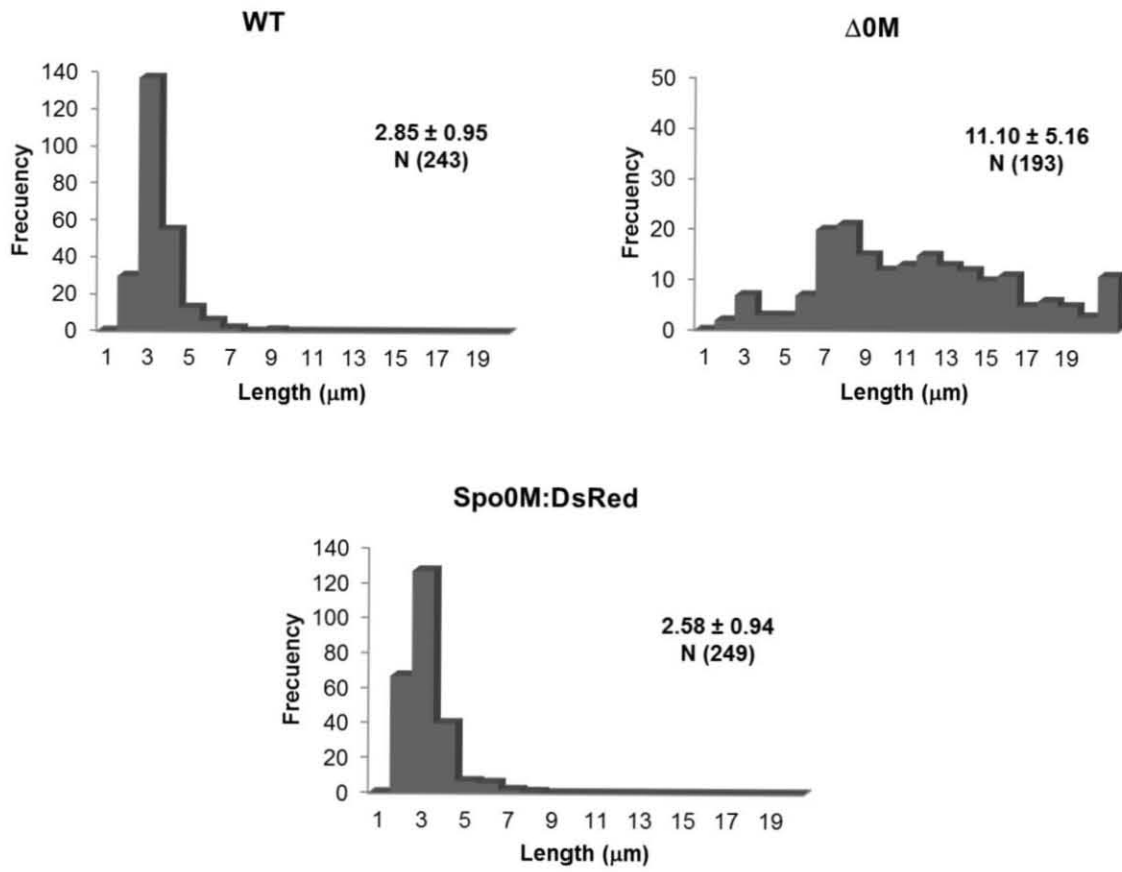
S2 Fig.



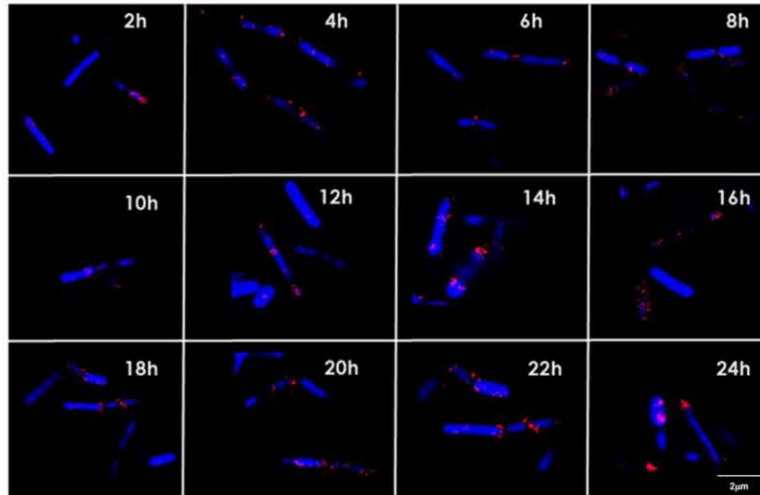
S3 Fig.



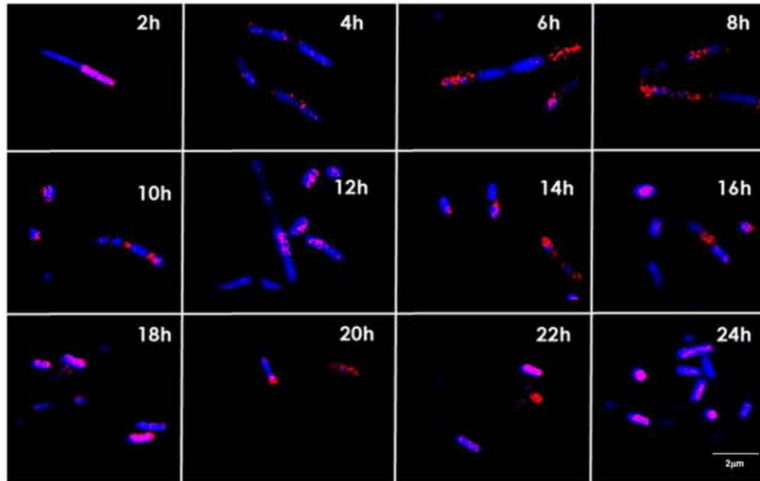
S4 Fig.



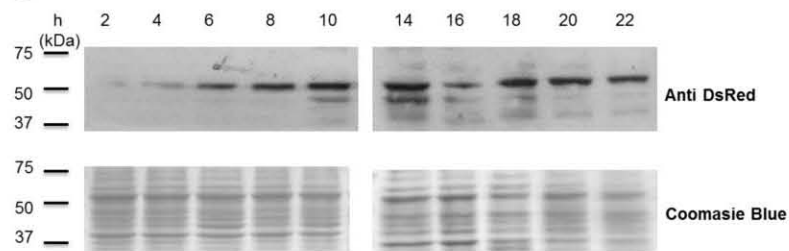
A



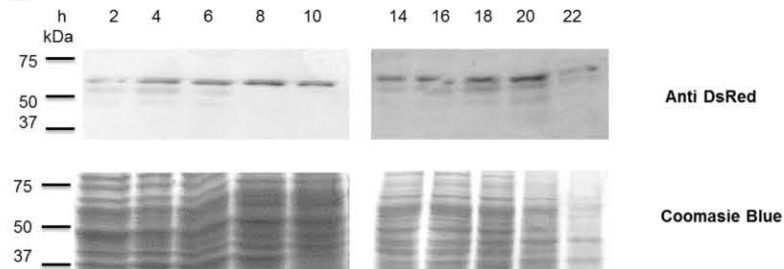
B



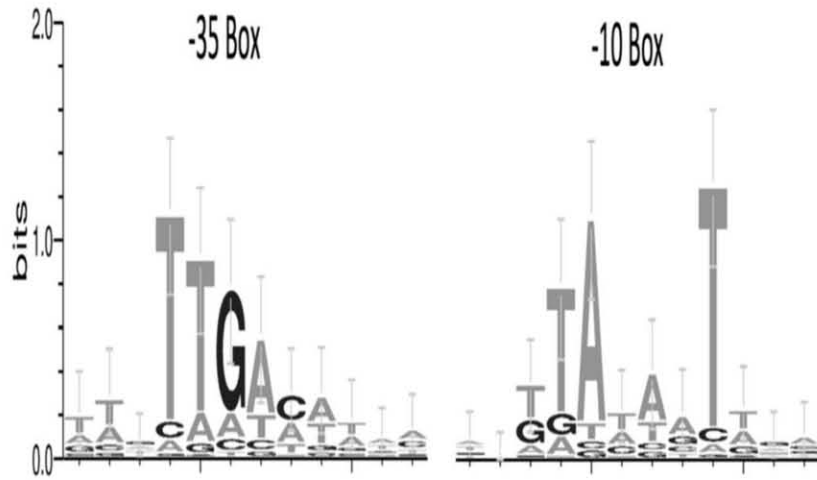
C



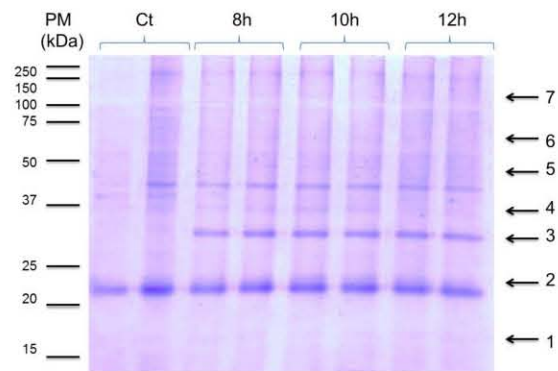
D



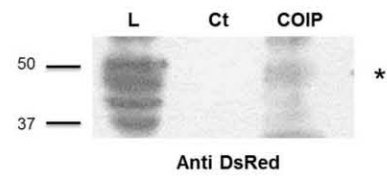
S6 Fig.



S7 Fig.



S8 Fig.



S1 Table.

Supplementary Table 1. Possible interactors of Spo0M	
Name	Function
<i>Proteases</i>	
ClpC	ATPase subunit of ATP-dependent protease; serine protease [1].
ClpP	Proteolytic subunit of ATP-dependent proteases; protein quality control in processes like competence, sporulation and motility [2,3].
ClpY	ATPase subunit of ATP-dependent protease; serine protease [4].
ClpQ	ATP-dependent protease, belonging to a two component system ClpQ/ClpY [3].
FtsH	ATP-dependent metalloprotease, involved in cell division, sporulation and biofilm formation [5,6]. Degrades Spo0E and Rap phosphatases [5]. Degrades Spo0M [7]. Accumulates in the septum during cell division and sporulation [8].
PepF	Oligoendopeptidase involved in normal protein turnover. Overexpression causes delay in the onset of sporulation and competence [9].
<i>Kinases</i>	
HPrK	Serine kinase/phosphorylase involved in carbon catabolite repression [10].
RsbW	Serine kinase, regulates sigma B-dependent transcription [11].
<i>Repair machinery/Chaperones</i>	

GroEL	Chaperonin belonging to the HSP60 family, induced by heat shock; co-repressor for HrcA [12]. Lack of GroEL in <i>E. coli</i> generates filamentous cells [13].
DnaK	Class I heat shock protein, function in the folding of nascent peptides [14]. Downregulation of DnaK in <i>E. coli</i> causes filamentation and delocalization of FtsZ [13,15].
Trigger factor	Chaperone that interacts with the newly synthesized peptides; lack of <i>tig</i> generates filamentation [16]. Lack in <i>B. subtilis</i> causes a delay in spore germination [17].
PrsA	Molecular chaperone that works post-translocation of exported proteins [18]. Required for folding of PBP's [19].
<i>Sporulation</i>	
Spore coat protein E	Required to the coat assembly [20].
SpoIIAC	Present in the mother cell, necessary for the degradation of the cell wall after septum formation and before engulfment [21].
SpoIIIAH	Part of the transmembrane region that joins the mother cell to the forespore, necessary to the SigmaG expression and the coat assembly [22].
SpoIVD associated factor A	Probably involved in coat protein assembly, related to lysozyme resistance; also involved in germination [23].
YdcC	Unknown function. A null mutant shows defects in sporulation and in SigmaG expression. Probably involved in engulfment [24].
GerM	Hydrolysis of the cortex during germination [25,26].
GerKA	Sugar, aspartate and KCl receptor during germination [25,26].

GerQ	Necessary for germination [25,26].
Spo0A	Master regulator of sporulation, its phosphorylation determines the onset of the process [27].
Spore coat protein F	Involved in spore resistance [20].
SpoVR	Involved in cortex synthesis [28].
<i>Cell wall synthesis machinery</i>	
PBP3	Cell wall synthesis, probably involved in cell elongation [29].
PBP1	Cell wall synthesis during cell division [30].
PBP4	Cell wall synthesis, probably involved in cell elongation [29].
<i>Cytoskeleton and membrane dynamics</i>	
FtsZ	Analog of the eukaryotic tubulin, main component of the septum. It is indispensable for cell division and sporulation [31].
DivIVA	Avoid formation of aberrant septum in places where the chromosome is present; is located in areas of cell division in early stages and forms rings next to the septum that remains until the end of cytokinesis [32].
EzrA	Negative regulator of FtsZ polymerization, avoid its location in unspecific areas and maintain an available pool of the protein [33].
FtsA	Member of the MreB family of proteins, necessary for the stabilization of Z ring in the membrane and the recruitment of other elements of the divisome [34,35].
MreB	Homolog of the eukaryotic actin, essential for the maintenance of the cell shape; directs the synthesis of the cell wall [36,37].

SepF	Tethers FtsZ to the cell membrane during cell division, directs the movements of small filaments of FtsZ through the membrane [38].
FloA	Flotillin homolog; involved in lipid raft and membrane organization. When mutated it affects sporulation [39], biofilm formation, competence and cell morphology [40].
FtsE	ABC transporter part of the two component system FtsEX, necessary for cell wall elongation and phosphorylation of Spo0A [41].

S2 Table.

Strain/Plasmid	Features	References
<i>Strains</i>		
BS1A1	Wild type <i>B. subtilis</i> 168 derivative	[42]
SCK6	Em his nprE18 aprE3 eglS(DELTA)102 bglT/bglS(DELTA)EV <i>lacA::PxylA-comK</i>	[43]
Δ 0M	<i>lacA::PxylA-comK (erm), spo0MD::kan</i>	This work
Spo0M:DsRed	<i>lacA::PxylA-comK (erm), spo0M-dsred (sp)</i>	This work
FG347/GFP:ZapA	<i>amyE::Pxyl-gfp-zapA (cat)</i>	[44]
GFP:ZapA: Δ 0M	<i>amyE::Pxyl-gfp-zapA (cat), spo0MD::kan</i>	This work
GFP:ZapA/Spo0M:DsRed	<i>amyE::Pxyl-gfp-zapA (cat), spo0M-dsred (sp)</i>	This work
<i>Plasmids</i>		
pUCm	pUC19 derivative, lacking <i>lacZ</i> and <i>mcs</i> (amp)	This work
pSpo0MFla	pUCm derivative, <i>spo0M</i> (amp)	This work
p Δ 0M	<i>spo0MD::kan</i>	This work

pSGGS	<i>spo0M-dsred (sp)</i>	This work
pT7-MAT-FLAG	pT7:MATtag:MCS:FLAGtag (amp)	Commercial
pT7-Spo0M-FLAG	<i>spo0M:FLAGtag (amp)</i>	This work

S3 Table.

Oligonucleotide	Sequence
pUCmFw	TTA ACT GCA GAA CCA ATG CAT TGT ACA TTC AAA TAT GTA TCC GCT CA
pUCmRv	AAA GGG ATC CCG AGC CGG AAG CAT AAA GTG TAA AG
SpoFlaFw	TAA ACT GCA GAA CAA TGC ATT GCT AAA AAA ACA AAG GAG G
SpoFlaRv	TAT GGG ATC CCG CTC GGC ACC AAT TTT AC
SpoXIFw	AAT CCG CTC GAG CAA CGA CTC CTT TAT TTT CAA TAT TAT T
SpoKIIRv	AAT GGG GTA CCC GTC TAG GAT CTC TTC TAG CAC