

“Caracterización de sistemas de transducción de señales de *Streptococcus pneumoniae* involucrados en mecanismos de supervivencia en neumocitos.”

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas:

Por: Bioq. Nicolás Martín Reinoso Vizcaíno

Director: Prof. Dr. José Ricardo Echenique

Facultad de Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, 18 de marzo de 2020



C I B I C I



Director de Tesis:

Dr. José Echenique

Comisión Evaluadora:

Dra. Cecilia Becerra

Dra. Mariela Monti

Dr. Héctor Alex Saka

Dra. Teresa Damiani

“The secret to success: find something you love to do so much, you can’t wait for the sun to rise to do it all over again”.

Christopher Gardner.

“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina al mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso”.

Louis Pasteur (1822-1895).

Agradecimientos

Al culminar una etapa como es el doctorado, uno se da cuenta que este camino ha sido arduo y complejo, que por su puesto no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de muchas personas. Por eso quiero dar las gracias a todos ellos.

Ante todo, quiero agradecer al Dr. José Echenique (Pepe), por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme entrar en este mundo fascinante de la ciencia. Por haberme brindado todo su conocimiento y las herramientas posibles para poder desarrollarme como profesional y evolucionar como persona.

Al grupo Echenique, porque siempre, tanto en los buenos momentos como en las adversidades, hemos sabido trabajar en grupo y tirar siempre para adelante.

A Meli, por ser mi primera “tutora” y porque, a pesar de no haber compartido mucho tiempo de mesada, me enseñaste a ser perseverante y saber disfrutar lo que uno hace.

A Nubia, por haber sido como una hermana mayor que siempre trató de aconsejarme y ayudarme cuando las cosas no andaban bien y por disfrutar los buenos momentos.

A Nadia, por ser esa cuota de bondad y optimismo que siempre uno necesita. Gracias por contagiar esas buenas energías que siempre hacen falta para que todo funcione. Gracias por haberme soportado estos años y quiero que sepas que sos mi ezquisonte favorito (“va con mucho cariño”). Te aseguro que te espera un hermoso futuro, porque sos perseverante, una hermosa persona y porque simplemente te lo merecés.

A Mirelys, por haber viajado desde tan lejos y soportar mi mal humor. Espero que todos mis consejos y ayudas te hayan servido y también te deseo lo mejor para tu vida.

A Paulo (Paulette), el niño eterno. No hay palabras para describir lo que sos como compañero y mejor aún, como amigo. Gracias por haberme incorporado en el mundo burakero, y por disfrutar cada momento que compartimos. Tu vitalidad y humor son incomparables, y seguro que vamos a estar siempre conectados.

A mis amigos del CIBICI, que sin duda se han convertido en una parte muy importante de mi vida:

Pablin, el tipo con más paciencia y lentitud que conozco. Un hermano con todas las letras y un muy buen amigo con el que he sabido tener charlas muy profundas y poder compartir todo lo que pienso.

Mariano CDP, el famoso HDP, si bien te conocía de antes, descubrí una persona en la que puedo confiar siempre y pensar en voz alta. ¡Gracias Capitano!

Marian M, un amigo que valoro todos los días y con el puedo contar en todo momento. Gracias amic por todas las conversaciones de pasillo y los valiosos intercambios de ideas que tuvimos.

Cruz, un amigo de la facu, que la vida hizo que nos cruzáramos de nuevo en este instituto. Me encanta compartir con vos ideas, pensamientos y la pasión por el manto sagrado.

Dani por todas las charlas, consejos y la ayuda que siempre ofreciste.

Crico por contagiarme en todo momento tus ocurrencias y buen humor.

A todos los integrantes del laboratorio 119-120, porque sin duda, en menor o mayor medida, todos contribuyeron a que se pueda trabajar en un ambiente lo más amigable posible. A todos los directores: José, Alex, Graciela, Susana, Claudia, Ceci y Gastón, por ayudarme y darme constantemente consejos.

A todos los becarios del lab, con los que compartimos charlas, mates, asados, y que son sin duda el motor para que todo esto funcione: Cintia, Flor P, Flor V, Cande, Ale, Lau G, Vani, Anita, Lucille, Andre, Jesi, Lau R, Euge, Ruso, Lucy, Anita E, Jade, Delfi y Clari.

A mini Lu, un párrafo aparte. Una amiga que encontré en el laboratorio y que siempre me escuchó, alentó y me compartió sus experiencias y pensamientos de una manera sin igual. Gracias por todos los momentos que compartimos y que supimos sacar a una sonrisa a todo.

A todos los integrantes del CIBICI y Departamento de Bioquímica Clínica, por mantener esa vocación por la ciencia, aún en los momentos más desfavorable para el desarrollo de la investigación.

A todo el personal de apoyo del CIBICI: Gabi, Lau G, Paula A, Pili, Ale R y a las secretarías del departamento, en especial, a Adri, que hace fácil todo lo difícil.

A el personal de apoyo de CEMINCO: Carlos, Ceci, Gonzalo y Pili, por toda la buena predisposición y buena onda que tiene para ayudar.

A los amigos de San Juan que, si bien no tienen ni idea lo que hago laboralmente, siempre creen en mí y me apoyan constantemente aún en la distancia. La vida me dio unos hermanos de corazón y siempre los voy a querer, en especial a Renzo, Lea, Víctor, Leo, Negro, Potoko, Nacho, Edu, Rami, Guille y Soto.

A la Escuela Normal y Escuela Industrial de San Juan y a la Facultad de Ciencias Químicas, por la educación brindada y por haberme preparado de la mejor manera, tanto en la vida como en lo académico.

A Flor, mi cuñada, por aguantarme en momentos muy difíciles y por saber compartir los buenos momentos, y sobre todo por hacer feliz a mi hermano.

A mi familia “política”. Gracias por abrirme las puertas de su casa y tratarme como un hijo más, Los quiero mucho: Adri, Pablo, Pili, Juampi y Sol.

A María Rosa, por todos los momentos vividos desde mi infancia, por tenerme presente y por ayudarme.

A Raúl, por haber sido un sostén inigualable en mi vida. Por haber asumido el rol de padrino a raja tabla y no dejarme sólo en ningún momento. Mi papá debe estar feliz de saber que su mejor amigo es una persona de fierro como lo sos vos. También a agradecer a su familia por siempre haberme aceptado como un integrante más.

A mi tía María Estér y mis primas Lore y Fer, por siempre tenerme presente en sus oraciones y mandarme tranquilidad en los momentos más adversos.

A mi abuela Juana, que a pesar de que partiste hace mucho, nunca borraré la dulzura que tenías en tus ojos y tu corazón lleno de amor.

A mi abuela Leli. Una leona que siempre nos defendió a mi hermano y a mí con uñas y dientes. Una segunda mamá, con un amor y cariño tan especial. Pícara, coqueta, sociable, graciosa, que no veía nada, pero si podía ver una pelotita de tenis en la tele. Nunca olvidaré todo lo que viví al lado tuyo, y siempre tus pastas y tus almuerzon serán las comidas más ricas para mí.

A mi hermano Fer. El famoso enano gruñón. Los hermanos no se eligen, pero por suerte te tengo a vos. Siempre me cuidaste y me ayudaste en toda mi vida. Debajo de esa coraza que parece inexpugnable, se aloja un corazón lleno de bondad y amor.

Por último, quiero agradecer a las personas que más me marcaron en la vida.

A mis papás Roberto y Carmén. Si tan solo hubieran hecho una céntecima parte de todo lo que hicieron y se esforzaron por mí, habría sobrado para que yo sea feliz. Mis referentes desde chico, mis héroes, porque pelearon siempre contra viento y marea para que no nos faltara nunca nada. Gordo, el orgullo que siento de ser tu hijo no tiene nombre. Saber que todos te recuerdan con una sonrisa por lo buena persona que fuiste, me llena el alma. Fuiste y sos el modelo a seguir en mi vida. Que decir de la mujer que sabe lo que me pasa en todo momento. La mujer que dejaría todo por que nos pase nada. Nunca vi tanta fuerza reunida en una sola persona. Gracias, gracias y gracias por todo lo que hicieron y hacen por mí. Sin la ayuda, comprensión y guía de ustedes, hoy no podría estar escribiendo estas palabras. ¡Los amo con todo mi corazón!

Y, por último, quiero dar las gracias a una persona muy especial: Emi. Mi compañera de trabajo y de vida. Agradezco a Dios, por el momento en que te conocí. Sin dudas convertiste mi vida en una aventura hermosa. Verte sonreír me llena el alma y me hace inmensamente feliz que todos los días me elijas, apoyes, que me ames y que compartas conmigo un proyecto. Infinitamente gracias por todo. Te amo.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	11
<i>1-STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE: HISTORIA, MICROBIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE VIRULENCIA</i>	<i>11</i>
<i>Un poco de Historia.....</i>	<i>11</i>
<i>Fisiología, estructura y condiciones de crecimiento.....</i>	<i>13</i>
<i>Epidemiología.....</i>	<i>13</i>
<i>Patogénesis y Factores de virulencia</i>	<i>14</i>
Cápsula de Polisacáridos (CPS).....	16
Neumolisina	17
Fosforilcolina (PCho).....	18
Proteínas de superficie bacteriana relacionadas a virulencia.....	18
Lipoproteínas	19
<i>2-VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE NEUMOCOCO.....</i>	<i>20</i>
<i>Sistemas de Dos Componentes (TCS).....</i>	<i>20</i>
<i>Sistemas de Dos Componentes en Neumococo</i>	<i>22</i>
Competencia	23
Autólisis	24
Respuesta de Tolerancia al Estrés Ácido	25
<i>Serín-treonín quinasa (StkP).....</i>	<i>25</i>
<i>3-INTERACCIÓN DE NEUMOCOCO CON EL HOSPEDADOR.....</i>	<i>27</i>
<i>Mecanismos de Adhesión del Neumococo.....</i>	<i>27</i>
<i>Mecanismos de internalización a la célula.</i>	<i>28</i>
<i>Internalización del neumococo</i>	<i>29</i>
<i>Autofagia y Xenofagia.....</i>	<i>30</i>
<i>Rol de la xenofagia en la vida intracelular del neumococo.....</i>	<i>32</i>
<i>4- EL VIRUS INFLUENZA</i>	<i>34</i>
<i>Clasificación de los virus influenza</i>	<i>34</i>
<i>Epidemiología.....</i>	<i>35</i>

<i>Genoma viral de influenza A</i>	36
<i>Estructura del virión de influenza A</i>	37
<i>Ciclo viral de influenza A</i>	38
<i>IAV y autofagia</i>	40
5-COINFECCIÓN CON IAV Y STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE	42
<i>Patogénesis de la coinfección</i>	42
Cambios en el tracto respiratorio.....	42
Cambios en la Respuesta Inmune.....	43
<i>Efectos bacterianos en la eliminación de IAV</i>	44
OBJETIVOS	45
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	46
RESULTADOS PARTE 1	47
PARTE 1: CONTRIBUCIÓN DE LA VÍA STKP/COME EN LA VIDA INTRACELULAR DE NEUMOCOCO	48
<i>RESULTADOS</i>	48
<i>La vía StkP/ComE induce cambios globales en el transcriptoma</i>	48
<i>Validación de resultados de RNA-seq</i>	50
<i>La vía StkP / ComE controla la producción de H₂O₂ y la respuesta al estrés oxidativo</i>	51
<i>La vía StkP/ComE regula la expresión de murN y modula la susceptibilidad a la lisis inducida por antibióticos</i>	52
<i>La sobrevivencia intracelular de S. pneumoniae en neumocitos es controlada por StkP/ComE</i>	54
<i>DISCUSIÓN PARTE 1</i>	56
RESULTADOS PARTE 2	60
PARTE 2: IMPACTO DE LA INFECCIÓN PREVIA CON EL VIRUS DE INFLUENZA A EN LA SOBREVIVENCIA INTRACELULAR DEL NEUMOCOCO EN NEUMOCITOS	61
<i>RESULTADOS</i>	61
<i>Modelo de coinfección de IAV y S. pneumoniae en neumocitos</i>	61
<i>Una infección previa con IAV produce un aumento de la sobrevivencia intracelular de neumococo en neumocitos</i>	65
<i>Identificación de sistemas de transducción de señales bacterianos involucrados en el mecanismo sinérgico inducido por la coinfección entre IAV y el neumococo</i>	67

<i>VisRH participa en la respuesta de neumococo al estrés ácido</i>	69
<i>La infección previa con IAV disminuye el número de neumococos intracelulares localizados en vesículas acídicas</i>	71
<i>VisRH participa en la respuesta de neumococo al estrés oxidativo</i>	72
<i>VisRH regula la expresión de genes relacionados al estrés</i>	76
<i>Análisis del proteoma de neumococo cultivado en condiciones ácidas</i>	78
<i>ClpL y PsaB están involucrados en la respuesta neumocócica al estrés y en el mecanismo sinérgico entre IAV y S. pneumoniae</i>	81
<i>El mecanismo sinérgico entre IAV y S. pneumoniae depende de la vía autofágica</i>	85
<i>La proteína viral M2 juega un papel clave en esta interacción</i>	92
DISCUSIÓN PARTE 2	96
CONCLUSIÓN FINAL Y PERSPECTIVAS	106
MATERIALES Y MÉTODOS	110
<i>CEPAS BACTERIANAS, CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y TRANSFORMACIÓN:</i>	111
<i>GENERACIÓN DE MUTANTES MEDIANTE MUTAGÉNESIS POR DELECCIÓN EN S. PNEUMONIAE</i>	111
<i>CEPAS VIRALES, OBTENCIÓN DE STOCKS DE TRABAJO Y TITULACIÓN</i>	112
<i>Ensayos de hemaglutinación</i>	113
<i>Ensayos de Dosis Infecciosa del 50% de Cultivo Tisular (DICT₅₀ o TCID₅₀)</i>	113
<i>TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS</i>	114
<i>CONSTRUCCIÓN PARA EXPRESAR M2 DE IAV EN NEUMOCITOS A549</i>	114
<i>ENSAYO DE INFECCIÓN DE NEUMOCITOS A549 CON S. PNEUMONIAE</i>	115
<i>Cuantificación de la sobrevivencia intracelular (ensayo de protección con gentamicina)</i>	115
<i>Cuantificación de la sobrevivencia bacteriana intracelular en células A549 tratadas con Bafilomicina A1 o con N-acetil-cisteína (NAC)</i>	116
<i>ENSAYOS DE COINFECCIÓN CON IAV Y S. PNEUMONIAE</i>	116
<i>Ensayos de coinfección con tratamiento con amantadina</i>	117
<i>ENSAYOS IN VITRO DE S. PNEUMONIAE</i>	117
<i>Ensayos de sobrevivencia al H₂O₂</i>	117
<i>Ensayos de sobrevivencia al pH ácido</i>	118
<i>Ensayos de respuesta de tolerancia al ácido (ATR)</i>	118
<i>Medición de los niveles de H₂O₂ producidos por S. pneumoniae</i>	119
<i>Cultivo de bacterias para análisis de expresión diferencial de genes</i>	119

<i>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL MEDIANTE ENSAYOS DE RNA-SEQ.....</i>	<i>120</i>
Análisis de Expresión diferencial.....	120
<i>qRT-PCR.....</i>	<i>121</i>
<i>Proteómica Comparativa.....</i>	<i>121</i>
Análisis de datos del MS.....	122
<i>ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ENSAYOS DE WESTERN BLOTS.....</i>	<i>122</i>
<i>ENSAYOS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....</i>	<i>123</i>
TABLAS Y ANEXOS	124
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxi-ribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ASIL: Lisis inducida por estrés ácido (*acid-stress induced lysis*).

Asp: Aspartato.

ATR: Respuesta de tolerancia al estrés ácido (*Acid-stress Tolerance Response*).

Baf A1: Bafilomicina A1.

BHI: Infusión Cerebro-corazón (*Brain-Heart Infusion*).

Cbps: Proteínas de unión a la Colina (*Choline binding proteins*).

CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (*Center for Disease Control and Prevention*).

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima.

CPS: Cápsula de Polisacáridos.

CSP: Péptido estimulante de competencia (*Competence stimulating peptide*).

csRNA: ARN pequeño dependiente de Cia (*cia-dependent small RNA*).

DE: Desviación estándar.

DICT₅₀: Dosis infectiva del 50% de cultivo tisular.

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*).

DO: Densidad óptica.

ENI: Enfermedad neumocócica invasiva.

ER: Retículo endoplásmico.

GFP: Proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*).

GSH: Glutati6n reducido.

HA: Hemaglutinina.

His: Histidina.

HK: Histidin quinasa (*Histidine Kinase*).

HPT: Dominio de histidina fosfotransferasa.

IAV: Virus de la Influenza A.
IBV: Virus de la Influenza B.
ICV: Virus de la Influenza C.
IP: Ioduro de propidio.
IRES: Sitio de entrada interno al ribosoma (*Internal ribosome entry site*).
LIR: Dominio de interacción con LC3 (*LC3-interacting Region*).
MCS: Sitio de clonado múltiple (*Multiple cloning site*).
MOI: Multiplicidad de infección (*Multiplicity of Infection*).
NA: Neuraminidasa.
NAC: N-acetil-L-cisteína.
NEP: Proteína de exportación nuclear (*Nuclear export protein*).
NP: Nucleoproteína.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
ORFs: Marcos abiertos de lectura (*open reading frames*).
PAF: Factor activador de plaquetas (*Platelet-activating factor*).
PCaV: Vesícula autofágica que contiene neumococo (*Pneumococcal-containing autophagic vesicle*).
PCho: Fosforilcolina.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*).
PCV: Vesícula que contiene neumococo (*Pneumococcal-containing vesicle*).
PG: Peptidoglicano.
PI3P: Fosfatilinositol 3-fosfato (*phosphatidylinositol-3-phosphate*).
pIgR: componente secretor del receptor de inmunoglobulinas poliméricas.
Ply: Neumolisina.
PS: Fosfatidilserina (phosphatidylserine).
QSS: Sistema de percepción de cuórum (*Quorum-sensing System*).
RFP: Proteína fluorescente roja (*Red Fluorescent Protein*).
rPAF: Receptor del factor activador de plaquetas.
ROS: Especies reactivas del oxígeno (*Reactive-oxygen species*).
RR: Regulador de respuesta.

SA: Ácido siálico (*Sialic Acid*).

sARN: Ácido ribonucleicos pequeños.

SEM: Error estándar de la media (*standard error of the mean*).

Ser: Serina.

Spn: *Streptococcus pneumoniae*.

TCS: Sistema de dos componentes (*Two-Component System*).

THYE: Medio Todd-Hewitt + extracto de levadura (*Todd-Hewitt Yeast Extract Medium*).

Thr: Treonina.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

vRNP: Ribonucleoproteína viral.

Resumen

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae es una bacteria Gram-positiva con un alto impacto en la salud humana y es el agente causal de otitis, sinusitis, así como de enfermedades graves como neumonía adquirida en la comunidad, sepsis y meningitis. Esta bacteria patógena es un colonizante natural de la nasofaringe humana, que bajo ciertas condiciones puede diseminarse a los pulmones pudiendo incluso acceder a la circulación sanguínea sistémica. En este proceso la bacteria interactúa con las células epiteliales del aparato respiratorio y el endotelio vascular. Luego de la adhesión a células epiteliales se promueven los eventos de internalización e invasión. Aunque *S. pneumoniae* se considera un patógeno extracelular típico, recientemente se ha reportado un mecanismo de supervivencia intracelular. En este estadio, la bacteria se enfrenta a diversas condiciones adversas impuestas por la célula hospedadora, como el estrés ácido y oxidativo. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso no están dilucidados. Por dicho motivo, el objetivo del presente trabajo de Tesis fue tratar de elucidar vías de señalización y factores claves de neumococo involucrados en su mecanismo de sobrevivencia intracelular en neumocitos.

Anteriormente, en nuestro laboratorio se describió una nueva vía de señalización en donde la serin-treonin quinasa StkP es capaz de fosforilar al regulador de respuesta ComE bajo condiciones de estrés ácido. El objetivo de la primera parte de esta tesis fue dilucidar cuál es el rol que cumple esta vía en la fisiología bacteriana. Para identificar los genes regulados por esta vía en condiciones ácidas, se realizó un análisis transcriptómico comparativo entre la cepa salvaje y la mutante *comE^{ET128A}* (variante de ComE no fosforilable por StkP). Se detectó una expresión diferencial de 104 genes involucrados en diferentes procesos celulares, lo que sugiere que la vía StkP/ComE induce cambios globales en respuesta al estrés ácido en *S. pneumoniae*. La mutante *comE^{ET128A}* mostró una menor capacidad de lisis inducida y una mayor respuesta adaptativa frente al estrés ácido. Por otra parte, la represión de los genes *spxB* y *sodA* en esta mutante se correlacionó con una disminución de la producción de H₂O₂. En conjunto, estos fenotipos pueden justificar el aumento observado en la sobrevivencia de la mutante *comE^{ET128A}* en neumocitos, indicando que la vía StkP/ComE controla procesos asociados a la respuesta a estrés que repercuten en el mecanismo de sobrevivencia intracelular del neumococo.

Por otra parte, se ha descrito que ocurren frecuentemente infecciones bacterianas secundarias causadas por *S. pneumoniae* en pacientes infectados primeramente con el virus de la influenza A (IAV) epidémico o pandémico. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes de este sinergismo no se conocen en profundidad. En la segunda parte de este trabajo, revelamos que una infección

previa por IAV incrementa la supervivencia intracelular neumocócica en neumocitos y que el sistema de dos componentes (TCS) VisRH es esencial para este fenotipo. Mediante un análisis transcriptómico comparativo entre las cepas $\Delta visR$ y wt, se detectó que VisRH regula la expresión de un gran número de genes. Algunos de estos genes están involucrados en la respuesta al estrés, como *clpL* y *psaB*, que codifican para una proteína chaperona (ClpL) y un transportador de Mn^{+2} (PsaB), respectivamente. Adicionalmente, se observó que tanto $\Delta visR$ como las cepas mutantes $\Delta clpL$ y $\Delta psaB$, cuya expresión génica está controlada por el sistema VisRH, presentan mayor susceptibilidad al estrés ácido y oxidativo. Estas mutantes no evidenciaron un aumento de la sobrevivencia intracelular en las células de neumocitos infectadas con IAV, lo que sugiere que VisRH estaría controlando vías de adaptación al estrés que permiten que *S. pneumoniae* incremente su supervivencia intracelular en neumocitos previamente infectados con IAV. Por otro lado, demostramos que el bloqueo del flujo autofágico producido por IAV es esencial para el desarrollo de este fenotipo. En este mecanismo, la proteína viral M2 cumple un rol clave y la sola expresión de M2 es suficiente para reproducir lo observado en células coinfectadas con IAV y *S. pneumoniae*. En base a estos resultados, se plantea un posible mecanismo mediante el cual *S. pneumoniae* incrementa su sobrevivencia intracelular en el contexto de células infectadas con IAV, el cual depende de factores bacterianos, virales y eucariotas.

Los resultados de esta tesis contribuyen al conocimiento de los procesos regulatorios ejercidos por los sistemas de transducción de señales en la fisiología y patogenia de *Streptococcus pneumoniae*.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive bacterium with a high impact on human health, being a causal agent of otitis, sinusitis, as well as severe diseases such as community-acquired pneumonia, sepsis, and meningitis. This pathogenic bacterium is a natural colonizer of the human nasopharynx and has the ability to spread to the lungs, being able to access the systemic blood circulation from the respiratory tract. In this process, the bacteria interact with epithelial cells and vascular endothelium. After adhesion to epithelial cells, internalization and invasion events are promoted. Although *S. pneumoniae* is considered a typical extracellular pathogen, an intracellular survival mechanism has recently been reported. However, the molecular mechanisms underlying this process are not entirely clear. For this reason, this thesis aimed to elucidate bacterial signaling pathways and key factors that mediate intracellular survival out of *S. pneumoniae*.

Previously, a new signaling pathway where StkP is capable of phosphorylating ComE under acidic conditions was identified in our laboratory. Thus, the first part of this thesis focused on elucidating the role of this pathway in bacterial physiology. To identify the genes regulated by the StkP/ComE pathway under acidic conditions, a comparative transcriptomic analysis was carried out between the wt strain and a *comE^{T128A}* mutant (a non-phosphorylatable variant of ComE). Differential expression of 104 genes involved in different cellular processes was detected, suggesting that the StkP/ComE pathway induces global changes in response to acid stress. The mutant strain showed a lower capacity for acid stress-induced lysis and a greater adaptive response to acid stress. Additionally, repression of the *spxB* and *sodA* genes was correlated with decreased production of H₂O₂. Together, these observations may explain the increased intracellular survival of the *comE^{T128A}* mutant in pneumocytes and indicate that the StkP/ComE pathway controls processes associated with the stress response relevant for intracellular survival of *S. pneumoniae*.

On the other hand, viral-bacterial synergism involved in secondary bacterial infections caused by *S. pneumoniae* after infection with epidemic or pandemic influenza A virus (IAV) is well documented. However, the molecular mechanisms behind such synergy remain ill-defined. In the second part of this thesis, we revealed that a previous IAV infection increased pneumococcal intracellular survival in pneumocytes and that the Two-Component System (TCS) VisRH was essential for this phenotype. By comparative transcriptomic analysis between the Δ *visR* and wt strains, we detected that this TCS regulates the expression of 179 genes. Some of these genes are involved in stress response, such as *clpL* and *psaB*, encoding a chaperone and a Mn⁺² transporter, respectively. Additionally, both, the Δ *visR* and the mutant strains Δ *clpL* and Δ *psaB* (whose gene expression is controlled by the VisRH system) showed greater susceptibility to acid and oxidative stresses. However, these mutants did not

show an increase in intracellular survival in pneumocytes previously infected with IAV. These results indicate that VisRH may be controlling adaptative responses to stress that mediate increased intracellular survival of *S. pneumoniae* in the context of IAV infection. Additionally, we observed that blocking the autophagic flow produced by IAV was essential for the development of this phenotype. Moreover, the single expression of the IAV protein M2, was sufficient to reproduce what our observations in cells co-infected with IAV and *S. pneumoniae*. Based on these results, we propose a mechanism involving bacterial, viral and eukaryotic factors, which mediates *S. pneumoniae* increased intracellular survival in the context of IAV-infected cells

The results of this thesis contribute to the understanding of the regulatory processes triggered by signal transduction systems in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1-Streptococcus pneumoniae: historia, microbiología, epidemiología y factores de virulencia

Streptococcus pneumoniae (o también conocido como el neumococo) es una bacteria de gran impacto en salud pública, que habita normalmente en el tracto respiratorio superior. Aunque *S. pneumoniae* se encuentra colonizando la nasofaringe humana, puede causar enfermedades letales como neumonía, meningitis y sepsis, especialmente en personas inmunocomprometidas, ancianos y niños menores a 5 años. Además, es el agente causal de infecciones locales tales como otitis media y sinusitis, y en menor frecuencia de otras enfermedades invasivas tales como endocarditis, artritis séptica y peritonitis.

Un poco de Historia...

S. pneumoniae fue descrito por primera vez en 1881 por el Dr. Louis Pasteur en Francia, quien aisló esta bacteria de la saliva de un paciente con rabia denominándola "*Microbe septicémique du salive*". Paralelamente, en el laboratorio del Dr. Stenberg en Estados Unidos se la llamó curiosamente "*Micrococcus pasteurii*". Mientras que la asociación entre neumococo y neumonía lobar se describió por primera vez en 1883 por Friedlander y Talamon, la neumonía neumocócica se confundió con otros tipos de neumonías hasta el descubrimiento de la tinción de Gram en 1884. Posteriormente, en 1893, M. Matray aplicó el término "*pneumoniekokken*" a este organismo y Albert Fraenkel fue quien adoptó el nombre de "*pneumokokkus*" en 1886. Anton Weichselbaum sugirió el nombre de "*Diplococcus pneumoniae*" en 1887, debido a la disposición que este microorganismo mostraba en muestras de esputo de pacientes teñidas con la tinción de Gram. Esta fue su denominación oficial hasta que fue reclasificado como *Streptococcus pneumoniae* en 1974 sobre la base de su de crecimiento en cultivos líquidos en forma de cadenas (Gray and Musher 2008).

Desde su descubrimiento a finales del siglo XIX, la revisión histórica de *Streptococcus pneumoniae* pone de manifiesto lo significativo que ha sido su estudio para el desarrollo de la Microbiología y el avance científico. A principios de la década de 1890, los hermanos Felix y Georg Klemperer, a través de sus estudios enfocados en la infección por el neumococo, desarrollaron el concepto de la inmunidad humoral. Ellos observaron que, si inoculaban neumococos muertos en conejos, éstos eran

capaces de sobrevivir a una infección subsiguiente con neumococos. Luego demostraron que conejos que no habían estado en contacto con el neumococo podían protegerse con una infusión de sueros de conejos inmunizados y también con sueros de pacientes que se recuperaban de una neumonía (Watson et al. 1993).

El afamado inmunólogo Eli Metchnikoff fue el primero en observar que los neumococos se aglutinaban en presencia de antisuero específico, pero no fue capaz de establecer ningún vínculo con el proceso de fagocitosis, fenómeno que fue descrito por primera vez por él (Gray and Musher 2008; Metchnikoff 1891).

A principios del siglo XX, Neufeld observó microscópicamente un fenómeno de “hinchazón de la cápsula” cuando un antisuero específico se adicionaba a una suspensión de neumococo. Este efecto se denominó “*Quellung*” (del alemán “hinchazón”), y fue la base de la identificación de los serotipos 1, 2 y 3 de neumococo, clasificando los demás serotipos como serotipo 4. Transcurrieron muchos años hasta que Cooper y colegas, en Estados Unidos, y Erna Lund, en Dinamarca, desarrollaran una colección de antisueros que permitieran la identificación de los más de 90 serotipos que se conocen actualmente (Gray and Musher 2008).

La aparente discrepancia entre la inmunidad humoral y celular que existía a principios de siglo XX se resolvió en 1904, cuando Neufeld y Rimpau demostraron que la ingesta de neumococos por parte de los glóbulos blancos se facilitaba en gran medida por la pre-exposición de las bacterias al suero de un animal previamente inmunizado. El fenómeno que demostraron fue lo que ahora llamamos opsonización (del griego: “*preparar alimentos*”), en el que el recubrimiento de bacterias con componentes del complemento e inmunoglobulinas conduce a la captación de las bacterias por las células fagocíticas. Estudios posteriores permitieron establecer los mecanismos de activación de la vía clásica y alterna del complemento (Gray and Musher 2008; Musher 2009; Watson et al. 1993).

Pero quizás la contribución más importante de *Streptococcus pneumoniae* al avance de la ciencia fueron los estudios que condujeron al descubrimiento del ADN como unidad básica del material genético. A comienzos del siglo XX, L.M. Stryker observó que cultivos seriados de neumococo producían colonias rugosas y que eran avirulentas debido a que perdían la capacidad de producir material capsular (Stryker 1916). En el año 1928, el científico alemán Frederick Griffith reportó un trabajo que sugería que esta bacteria era capaz de transferir material genético en un proceso que denominó transformación (Griffith 1928). En estos experimentos se realizaron inyecciones intraperitoneales a ratones con una mezcla de una cepa acapsular tipo II con una cepa encapsulada tipo III inactivada por calor, produciendo la muerte de los ratones y recuperando de sus tejidos bacterias encapsuladas tipo III. Griffith concluyó que la bacteria tipo II se “transformó” en una

bacteria tipo III. Esta observación permaneció sin explicación hasta que en 1944 Avery, MacLeod y McCarty demostraron concluyentemente que el ADN era el material genético responsable de los cambios fenotípicos observados en el proceso de transformación (Avery, Macleod, and McCarty 1944).

Fisiología, estructura y condiciones de crecimiento

S. pneumoniae es un coco Gram positivo cuyo tamaño varía de 0,5 a 1,2 µm de diámetro, presenta una forma oval con un extremo lanceolado, se dispone de a pares (diplococos) y puede formar cadenas cortas, principalmente si crece en medios líquidos. Es una bacteria anaerobia aero-tolerante y requiere de diversos nutrientes específicos, tales como proteínas y suplementos hematológicos, por lo que es considerada una bacteria fastidiosa para su cultivo. Los medios artificiales que aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento de *S. pneumoniae* se encuentran enriquecidos mediante la adición de sangre de carnero. Esta bacteria carece de la enzima catalasa, pero a su vez produce una gran cantidad de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Es por esto que su crecimiento se ve favorecido por la catalasa proporcionada por los eritrocitos de la sangre de carnero. En medios sólidos, crece formando colonias de 1 a 3 mm de diámetro redondas, mucosas y no pigmentadas, las cuales al cabo de 48 horas presentan un aspecto umbilicado, con una depresión central producida por una autólisis celular progresiva. En estos medios con sangre las colonias producen α hemólisis (digestión parcial de la hemoglobina a biliverdina), mostrando un halo verdoso. La mayoría de las cepas *S. pneumoniae* son sensibles a la optoquina, y en presencia de bilis o sales biliares se induce un proceso de muerte llamado autólisis. Estas características fenotípicas son esenciales para la identificación de especie.

Epidemiología

S. pneumoniae es el principal agente causal de infecciones como otitis media y sinusitis, así como también de enfermedades severas invasivas. La neumonía adquirida en la comunidad es la principal afección producida por este patógeno, seguida de septicemia y meningitis. En Estados Unidos, en el año 2017, la neumonía con bacteremia asociada representó el 69,3 % de las enfermedades neumocócicas invasivas (ENI), seguida de bacteremia sin ningún foco infeccioso (16,4%) y de meningitis (6,9%), según datos del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, "Center for Disease Control and Prevention") (CDC 2017). La neumonía es la causa infecciosa más común de mortalidad, produciendo alrededor de 1 millón de muertes en niños menores de 5 años en todo el mundo. A pesar de la introducción de la vacuna conjugada en 135 países hacia finales de 2017, la enfermedad neumocócica sigue causando la mayor cantidad de muertes

entre las enfermedades prevenibles por vacunación, según la OMS (Kim et al. 2016; Organization 2014). Los grupos con mayor riesgo de ENI incluyen niños menores de 2 años de edad, adultos mayores de 65 años, personas con complicaciones crónicas subyacentes y pacientes con inmunosupresión. Con la introducción de las vacunas conjugadas (PCV7 y PCV13) a los calendarios nacionales de vacunación de cada país se han reducido considerablemente los casos de infecciones invasivas asociadas a neumococo. A pesar de la disminución de incidencia de casos, se ha reportado un incremento de ENI debido a serotipos no incluidos en ninguna de las dos vacunas (Ladhani et al. 2018; Shiri, McCarthy, and Petrou 2019).

Aunque neumococo es uno de los patógenos más importantes del ser humano, comúnmente se encuentra colonizando la nasofaringe humana. Se estima que alrededor de más del 50% de niños menores de 5 años son portadores de esta bacteria, pudiendo este porcentaje llegar hasta casi un 80% en países con bajo ingresos per cápita (Adegbola et al. 2014). Por otra parte, es importante destacar que, si bien el porcentaje de adultos portadores de *S. pneumoniae* es considerablemente menor al grupo etario infantil, nuevos estudios de epidemiología molecular sugieren que dichos porcentajes están subestimados, principalmente en adultos jóvenes que no tienen hijos (Wyllie et al. 2016). Se conocen actualmente más de 95 serotipos capsulares, con diferencias estructurales y antigénicas en los polisacáridos que constituyen la cápsula (Geno et al. 2015).

La diseminación de *S. pneumoniae* se produce de persona a persona a través de gotas o aerosoles de portadores o infectados. Las bacterias ingresan a la cavidad nasal y allí deben ser capaces, para poder establecerse, de desplegar todo su arsenal para poder competir con la microbiota residente, lograr evadir la respuesta inmune que ella misma induce y de adherirse a células epiteliales nasofaríngeas (Donkor 2013). Esta adherencia ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro* y es considerada el primer paso antes de la colonización y/o invasión eficiente (Andersson et al. 1983; Bogaert, De Groot, and Hermans 2004; Cundell et al. 1995; Weiser et al. 1996). Una vez establecido en la nasofaringe, este patógeno puede permanecer como colonizante o bien, bajo ciertas circunstancias, migrar hacia otras localizaciones del organismo como el oído medio, senos paranasales y pulmones pudiendo ingresar al torrente sanguíneo, a partir del cual puede diseminarse a cualquier órgano e incluso atravesar la barrera hematoencefálica para causar meningitis.

Patogénesis y Factores de virulencia

Como toda bacteria patógena, neumococo posee diversas herramientas que le posibilita colonizar a su hospedador, para luego diseminarse y establecer exitosamente una infección. Se considera que la colonización de la nasofaringe es un pre-requisito necesario para el establecimiento de un proceso

infeccioso producido por *S. pneumoniae* (Weiser, Ferreira, and Paton 2018). La propagación local lleva al establecimiento de la bacteria en el oído medio y en los senos paranasales, mientras que la principal vía de entrada a los pulmones es por medio de la aspiración de las secreciones faríngeas. La disrupción de las barreras epiteliales y endoteliales permiten la entrada al torrente sanguíneo y el establecimiento de infecciones invasivas como meningitis (Weiser, Ferreira, and Paton 2018). Cabe recalcar, que la bacteriemia no es una condición necesaria para el desarrollo de una infección en las meninges, puesto que en modelos animales se ha establecido que neumococo puede invadir neuronas olfatorias de la nasofaringe e ingresar al sistema nervioso central mediante transporte axonal retrógrado (Weiser, Ferreira, and Paton 2018; van Ginkel et al. 2003).

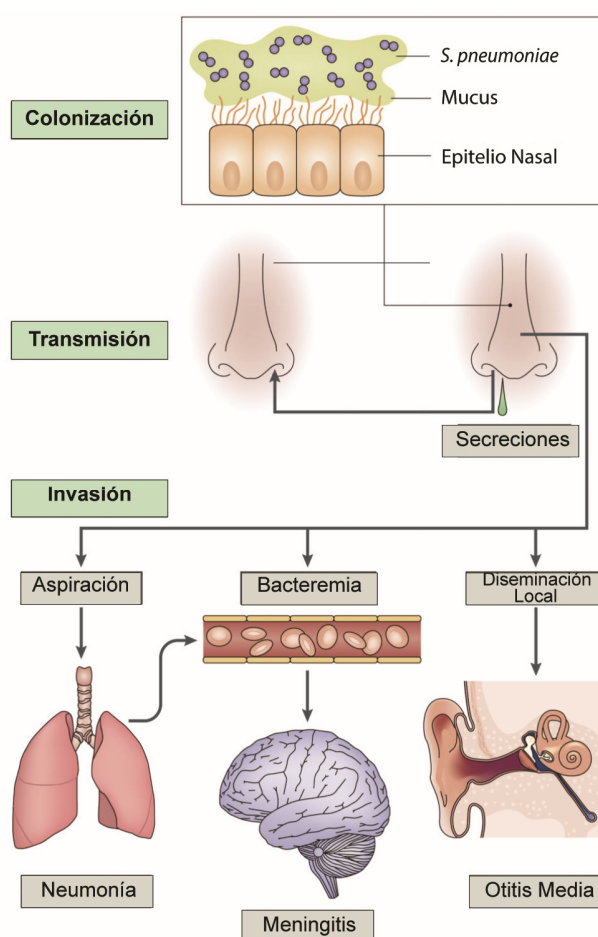
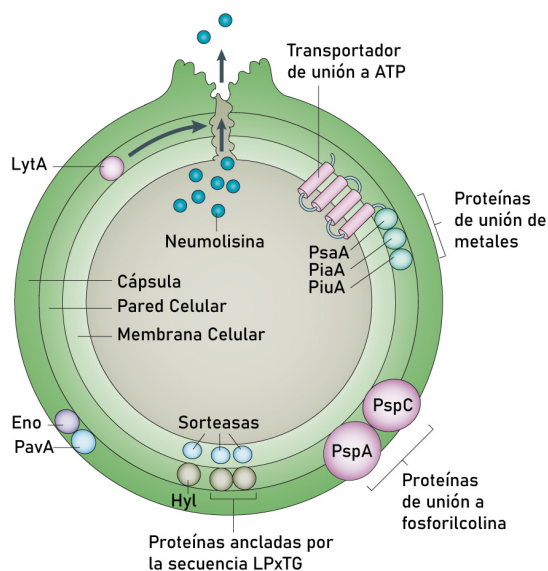


Figura 1. Transmisión, colonización e invasión de *S. pneumoniae*. Neumococo coloniza la mucosa del tracto respiratorio superior. Esta colonización es un pre-requisito tanto para la transmisión como la invasión de la bacteria. Su diseminación a otras áreas, ya sea por aspiración, introducción al torrente sanguíneo o por diseminación local, puede conducir a infecciones invasivas como neumonía, meningitis, o infecciones más leves como otitis media (adaptado de Weiser et al. 2018).

Si bien es considerada una bacteria extracelular, cada vez hay más evidencia de que puede encontrarse en nichos intracelulares, con el objetivo de evitar la respuesta inmune y poder traspasar barreras epiteliales y endoteliales. Los mecanismos que permiten la colonización de la nasofaringe y promueven la invasividad están asociados con la expresión de factores de virulencia (Figura 1). Estos factores corresponden a un grupo de proteínas, toxinas o estructuras de carbohidratos que son secretadas o bien depositadas en la superficie externa de la bacteria. Los mismos no afectan la vitalidad del microorganismo, sin embargo, facilitan la evasión inmune, la adherencia y la invasión de la célula hospedadora.



+

Figura 2. Factores de virulencia de neumococo. Entre los determinantes de virulencia en *S. pneumoniae* contribuyen a la patogenia de la bacteria, se destacan la capsula, la pared celular, proteínas unidoras de colina, proteínas de superficie, neumolisina, autolisina y las proteínas de unión a metales. La expresión de algunos de estos componentes está regulada por mecanismos de señalización intracelular, como los sistemas de dos componentes (*adaptado de Kadioglu, 2008*).

Cápsula de Polisacáridos (CPS)

La producción de una cápsula extracelular de polisacáridos (CPS) es una característica que *S. pneumoniae* comparte con otras bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Klesbiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*. La CPS es considerada como uno de los factores de virulencia más importantes del neumococo, puesto que no se han aislado cepas no capsulares de pacientes con enfermedad neumocócica invasiva (ENI). Su contribución a la virulencia se basa principalmente en su actividad antifagocítica, dada su capacidad de inhibir la interacción de la porción Fc de las inmunoglobulinas y del componente C3b del sistema del complemento con sus

respectivos receptores en las células fagocíticas (Donkor 2013; Mitchell and Mitchell 2010; Kadioglu et al. 2008; Hyams et al. 2010). La cápsula también es crucial para la colonización, ya que facilita el acceso a la superficie epitelial a través de las secreciones mucosas del hospedador y reduce la autólisis asociada a antibióticos (Nelson et al. 2007; Fernebro et al. 2004).

Para la colonización del hospedador, neumococo requiere de la adherencia al epitelio, proceso en el cual las proteínas asociadas a la pared celular cumplen un rol esencial al unirse a receptores específicos de las células epiteliales. Resulta crucial que la bacteria sea capaz de regular la producción de la CPS para exponer estas adhesinas y permitir la unión a sus respectivos receptores. Por otro lado, la expresión máxima de la CPS es esencial para la virulencia sistémica. Por lo tanto, la regulación a nivel de transcripción, traducción y de modificaciones postraduccionales, de los genes que codifican para enzimas productoras de CPS, es una característica distintiva de *S. pneumoniae* que le otorga la capacidad de establecer un proceso patogénico eficiente (Kadioglu et al. 2008; Bogaert, De Groot, and Hermans 2004; Brown, Hammerschmidt, and Orihuela). Dicha propiedad recibe el nombre de *variación de fase*, debido a diferencias en la morfología de colonias crecidas en medios sólidos entre una cepa con una densa cápsula y otra con una delgada capa de exopolisacáridos.

Neumolisina

La neumolisina (Ply) es un miembro de la familia de citolisinas dependiente del colesterol que son sintetizadas por bacterias Gram positivas. Es producida como una proteína soluble de alrededor de 52 kDa y oligomeriza en la membrana celular de la célula blanco formando un poro transmembrana (Tilley et al. 2005). El principal mecanismo de liberación de Ply se produce por un proceso de autólisis mediada por la autolisina mayor (LytA), aunque se han reportado otras estrategias de secreción no asociadas a LytA (Balachandran et al. 2001). Ply cumple un rol fundamental en la patogénesis de neumococo y su función no sólo recae en su actividad lítica, sino que también, a concentraciones sublétricas, puede producir la inhibición del estallido respiratorio fagocítico, inhibir la barrida mucociliar, inducir una respuesta inflamatoria, activar la vía clásica del complemento, entre otras. Al liberarse Ply, ésta puede unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas (Ig) y C1q, activando la vía clásica del complemento. De esta manera se produce una reducción de la opsonización de la bacteria, por lo que se puede considerar como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Ali et al. 2013; Brown, Hammerschmidt, and Orihuela ; Kadioglu et al. 2008; Mitchell and Mitchell 2010; Mitchell et al. 1991).

Fosforilcolina (PCho)

Otro factor de virulencia importante en neumococo es la fosforilcolina (PCho), la cual forma parte de la pared celular neumocócica ya que está unida covalentemente a los ácidos teicoicos que componen dicha estructura, lo que la convierte en una pared inusual (Bean and Tomasz 1977). El requerimiento nutricional de colina es característico de *S. pneumoniae*, dado que sirve como una molécula de ensamble para la unión no covalente de proteínas en la superficie de la bacteria (Rosenow et al. 1997). La presencia de fosforilcolina como constituyente de la pared celular es compartida con otros microorganismos que residen en el tracto respiratorio superior, tales como *Haemophilus influenzae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y especies comensales y patógenas del género *Neisseria* spp. (Kadioglu et al. 2008). Debido a que muchas especies bacterianas que ocupan un nicho biológico similar expresan PCho en la superficie y a su vez poseen un conjunto de genes (*licA-D*) para su captación, esta molécula es considerada como un factor importante para la colonización. En neumococo, PCho media la adherencia bacteriana al receptor del Factor Activador de Plaquetas (rPAF), el cual se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos del hospedador, como así también en el epitelio de la nasofaringe humana (Cundell et al. 1995; Iuchi et al. 2019). El ligando fisiológico de este receptor es el Factor Activador de Plaquetas (PAF) cuya estructura y composición también contiene PCho. De esta manera, el neumococo imita al ligando y utiliza ese receptor como una de las vías de ingreso a la célula eucariota.

Proteínas de superficie bacteriana relacionadas a virulencia

Existen distintos grupos de proteínas de la superficie celular que intervienen como factores de virulencia. Entre ellas se pueden nombrar a proteínas de unión a colina (Cbps), lipoproteínas y proteínas que están unidas covalentemente a la pared celular bacteriana por un motivo carboxi-terminal de tipo (LPxTG)

Las Cbps están ancladas a la superficie celular a través de la interacción entre secuencias repetidas de 20 aminoácidos y **PCho** presente en la pared celular. Cuatro enzimas hidrolíticas de la pared celular que poseen dominios de unión a PCho (LytA, LytB, LytC y CbpE) han sido implicadas en virulencia.

LytA (N-acetilmuramil-L alanina amidasa) es la principal autolisina de neumococo y su activación desencadena la lisis de la pared celular liberando productos altamente inflamatorios, como la neumolisina. A su vez, **LytB**, **LytC** y **CbpE** están involucrados en la colonización nasofaríngea, así como también en la migración a través de la matriz extracelular (Frolet et al. 2010; Ramos-Sevillano et al. 2011). Otra importante Cbp es la proteína neumocócica de superficie A (**PspA**), la que interfiere

con el sistema del complemento y también se une a lactoferrina. Por otra parte, la proteína neumocócica de superficie C (**PspC o CbpA**) es un factor de virulencia multifuncional y su contribución a la virulencia varía entre diferentes cepas. **PspC** actúa como una adhesina anclada a PCho, se une al componente secretor humano presente en el receptor de inmunoglobulina polimérica y proporciona resistencia al complemento mediante la unión al Factor H.

Lipoproteínas

PsaA forma parte de un transportador ABC que transporta iones manganeso (Mn^{2+}). En este complejo, PsaA es la lipoproteína de unión al sustrato, PsaB es la proteína de unión al ATP y PsaC es la permeasa. Se ha demostrado que mutantes del gen *psaA* poseen menor virulencia en modelos murinos de bacteriemia, neumonía y colonización (McAllister et al. 2004; McCluskey et al. 2004; Rajam et al. 2008). En un estudio, se le atribuyó a PsaA un papel como adhesina al interactuar *in vitro* con E-Cadherina (Rajam et al. 2008). Aunque, dicha función como adhesina es actualmente discutida. Estudios estructurales señalan a PsaA como una proteína que no protruye fuera de la pared celular, por lo que quizás el efecto $\Delta psaA$ en la adhesión *in vivo*, se deba a un efecto pleiotrópico causado por deficiencia intracelular de Mn^{2+} (Kadioglu et al. 2008; Lawrence et al. 1998; Rajam et al. 2008). Probablemente, el papel más importante que cumple el transportador PsaABC sea la de protección frente al estrés oxidativo, ya que el Mn^{2+} es un cofactor muy importante de proteínas involucradas en respuestas a estrés, como es el caso de la superóxido dismutasa SodA (Honsa, Johnson, and Rosch 2013).

Otras lipoproteínas involucradas en la virulencia son **PiaA** y **PiuA**, las cuales participan en la captación de hierro (elemento esencial para la virulencia del neumococo) (Brown, Hammerschmidt, and Orihuela ; Honsa, Johnson, and Rosch 2013; Jomaa et al. 2005).

Este es un breve resumen de los principales factores de virulencia de neumococo que junto a varios más, forman parte del arsenal que posee esta bacteria para contrarrestar tanto las defensas del hospedador y como también para poder sobrevivir frente a la competencia de otras bacterias con las que comparte un mismo nicho biológico. Conocer el funcionamiento de cada uno de estos factores es fundamental para entender las estrategias y mecanismos que operan en el desarrollo de la enfermedad neumocócica.

2-Vías de Transducción de Señales de Neumococo

Una característica inherente a toda bacteria es la capacidad de percibir continuamente el entorno donde se encuentra para poder producir una respuesta adecuada y adaptarse a los cambiantes nichos microbianos. Muchas son las proteínas involucradas en estos complejos mecanismos de señalización en bacterias. Estas vías de señalización son cruciales para la correcta regulación de la expresión génica que permite a la célula bacteriana asegurarse un estado nutricional adecuado, responder ante distintos tipos de noxa, comunicarse con bacterias vecinas, integrar ADN foráneo para adquirir nuevas características, regular la expresión de los factores de virulencia, etc. La activación de estos sistemas puede ocurrir en respuesta a señales químicas (como la concentración de iones H⁺, metales, oxígeno, toxinas, nutrientes) o estímulos mecánicos (Harapanahalli et al. 2015).

Varios son los mecanismos de señalización conocidos hasta el momento en bacterias. Uno de los más estudiados son los denominados Sistemas de percepción de cuórum (QSS, del inglés “*Quorum-sensing System*”) involucrados en la comunicación entre células por medio de moléculas secretadas al medio conocidas como autoinductores. Otro modo involucra a los reguladores independientes, los cuales son proteínas que poseen un dominio de reconocimiento a un determinado ligando y un dominio de unión al ADN. Como ejemplo de este tipo de reguladores se puede citar a CcpA y CodY, los cuales están involucrados en la regulación del metabolismo del neumococo (Stenz et al. 2011; Carvalho et al. 2011; Caymaris et al. 2010; Motib et al. 2019). Otros mecanismos, que han sido descubiertos hace relativamente poco tiempo, involucran a las moléculas de ARN reguladoras como son los interruptores ribosomales (*riboswitches*) y ARN pequeños (sARN). Sin duda, los mecanismos de señalización más ampliamente estudiados en bacterias son los denominados Sistemas de Transducción de Señales de Dos Componentes, o simplemente, Sistemas de Dos Componentes (TCS, por sus siglas en inglés).

Sistemas de Dos Componentes (TCS)

Los TCS clásicos son cascadas de fosforilación compuestas por dos proteínas conservadas: una histidín-quinasa (HK) anclada a membrana, que actúa como sensor, y su correspondiente regulador de respuesta (RR). Cada HK consta de un dominio extracitoplasmático, generalmente en el extremo N-terminal, un dominio transmembrana y un dominio intracitoplasmático en la región C-terminal que posee un dominio de dimerización y un sistema de fosfotransferencia. Ante el reconocimiento de un determinado estímulo, la HK experimenta un cambio conformacional, la formación de

homodímeros y la autofosforilación ATP dependiente en un residuo conservado de histidina (His). Luego, el grupo fosfato es transferido desde His a su respectivo RR en un residuo conservado de ácido aspártico (Asp) en su dominio receptor. Esta fosforilación, produce un cambio conformacional en el dominio C-terminal del RR que permite su interacción con el sitio blanco, ya sea una proteína, una secuencia de ADN o incluso ARN. Por lo general, los RR son activadores y/o represores transcripcionales de genes mediado por la capacidad de unión al ADN. La gran mayoría de las HK presentan una actividad de fosfatasa hacia sus correspondientes RR (Gomez-Mejia, Gamez, and Hammerschmidt 2018; Groisman 2016; Laub and Goulian 2007).

Es importante destacar que existen distintas variantes de estos TCS clásicos que también contribuyen a la regulación de la homeostasis celular. Existen TCS híbridos, en los cuales los sensores albergan los dominios de las HK y los dominios receptores de los RR en mismo polipéptido. Una variante muy común de los TCS es el sistema de fosfotransferencia (*phosphorelay*, en inglés), donde una HK híbrida transfiere el grupo fosfato a una proteína con un dominio de histidín fosfotransferasa (HPT) y subsecuentemente al RR. Además, se ha descrito que algunos RR pueden ser fosforilados directamente por una molécula de bajo peso molecular donadora de grupo fosfato, como es el caso del acetil-fosfato (McCleary and Stock 1994). Estos sistemas de transducción, al estar ausentes en los organismos eucariotas, reciben atención como blancos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (Tiwari et al. 2017).

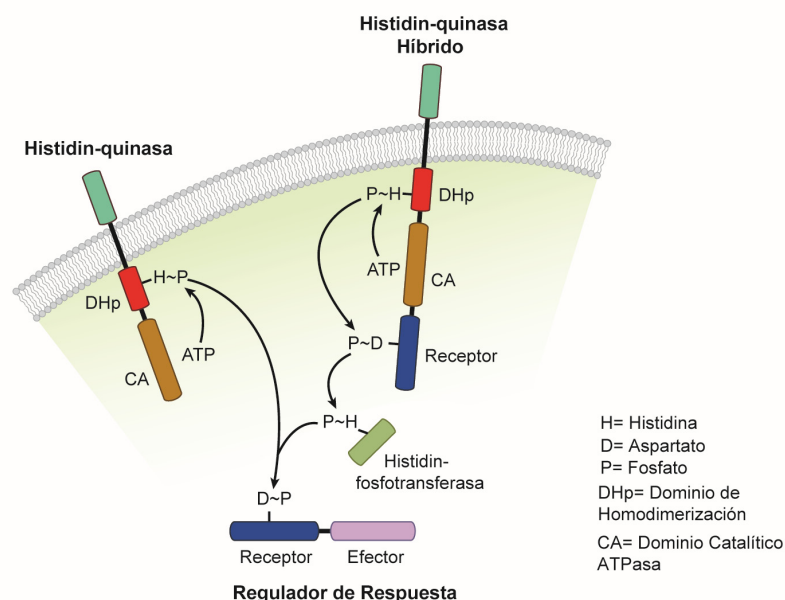


Figura 3. Sistemas de Dos Componentes (TCS). La detección de un estímulo externo es percibida por la Histidín Quinasa (HK) anclada en la membrana. Esta proteína transmembrana es fosforilada en un residuo conservado de histidina utilizando ATP intracelular. El grupo fosfato es posteriormente transferido a un residuo aspartato que pertenece al RR citoplasmático. La proteína RR fosforilada puede controlar la regulación génica por unión a regiones promotoras de los genes blanco. En los TCS híbridos la HK posee un dominio receptor que es fosforilado. Una histidín fosfotransferasa (HPT) luego transporta el grupo fosforilo de la quinasa híbrida a un regulador de respuesta soluble que contiene un dominio de salida (*adaptado de Laub and Goulian, 2007*).

Sistemas de Dos Componentes en Neumococo

El análisis del genoma completo de distintas cepas de neumococo permitió identificar 13 TCS y un RR huérfano (Lange et al. 1999; Throup et al. 2000). La mayoría de los sistemas identificados no poseen homología con otros géneros de bacterias, excepto TCS02 y TCS04. Los genes que codifican para HK y RR están ubicados de a pares, lo cual sugiere que forman parte de un operón y que su expresión constituye un sistema funcional de regulación. En base a la homología del dominio efector, es posible agrupar a cada RR de *S. pneumoniae* dentro de cuatro familias de proteínas que se unen al ADN. La mayoría de los RR forman parte de la familia de reguladores de **OmpR**: RR01, 02, 04, 05, 06, 08, 10 y 14. Por otra parte RR03 y RR11 pertenecen a la familia de **NarL**, RR07 y RR09 a la familia de **YesN**, mientras que RR12 y RR13 a la familia de **LytR**.

De los 13 TCS que posee neumococo, 8 de ellos han sido asociados con la virulencia de esta bacteria. En particular los TCS mejor estudiados son TCS12 (también llamado ComDE) y TCS05 (CiaRH). La contribución a la virulencia de cada TCS se encuentra resumida en la tabla 1.

TCS	Nombre	Rol demostrado en virulencia	Referencias
01	480	La inactivación de <i>hk/rr</i> conllevó a una dramática disminución del número de bacterias en un modelo de infección del tracto respiratorio en ratones.	(Hava and Camilli 2002; Lange et al. 1999; Throup et al. 2000)
02	492, <i>walRK</i> , <i>vicRK</i> , <i>micAB</i> , y <i>ycFG</i>	- <i>rr02</i> es el único regulador de respuesta esencial de neumococo. - Regulación del estado de competencia en condiciones de microaerobiosis. - Regulación de pared celular y biosíntesis de ácidos grasos. Regulador de la expresión de <i>pspA</i> .	(Echenique and Trombe 2001; Kadioglu et al. 2003; Mohedano et al. 2005; Wagner et al. 2002)
03	<i>liaRS</i> , 474	- Respuesta al estrés por vancomicina. - Participación en competencia en respuesta a ruptura del peptidoglicano. - No se evidenció rol en virulencia. - Asociada a regulación del factor de virulencia Pilus-1	(Haas et al. 2005; Rosch et al. 2008)
04	<i>prpRS</i> , 481	- En ciertas cepas controla la expresión de <i>psaA</i> , regula virulencia y resistencia al estrés oxidativo.	(McCluskey et al. 2004)

TCS	Nombre	Rol demostrado en virulencia	Referencias
05	<i>ciaRH, 494</i>	- Estrés ácido, competencia, virulencia, resistencia a cefotaxima. - Impedir la lisis inducida por la actividad de antibióticos que afectan la pared celular.	(Echenique, Chapuy-Regaud, and Trombe 2000; Marra, Asundi, et al. 2002; Mascher et al. 2006; Throup et al. 2000)
06	<i>cbpRS, 478</i>	- Regulación de factores de virulencia CbpA y PspA. - Asociada a regulación del factor de virulencia Pilus-1	(Rosch et al. 2008; Standish, Stroehrer, and Paton 2005; Throup et al. 2000)
07	<i>yesMN, 539</i>	- Involucrado en virulencia en un modelo murino.	(Hava and Camilli 2002; Throup et al. 2000)
08	<i>saeRS, 484</i>	- Metabolismo de celobiosas. - Regulación del pilus (cepa TIGR4).	(Song et al. 2009; McKessar and Hakenbeck 2007; Throup et al. 2000)
09	<i>zmpSR, 488</i>	- Rol importante en virulencia en modelos de neumonía y bacteriemia, dependiente de la cepa estudiada. - Regulación de transportadores tipo PTS.	(Hendriksen et al. 2007; Blue and Mitchell 2003; Hava and Camilli 2002; Throup et al. 2000)
10	<i>vncRS, 491</i>	- Tolerancia a vancomicina. - No se evidenció rol en virulencia.	(Haas et al. 2004)
11	<i>desKR, 479</i>	- Respuesta al estrés por vancomicina.	(Haas et al. 2005)
12	<i>comDE, 498</i>	- Competencia y autólisis. - Rol demostrado en virulencia	(Li et al. 2001; Hava and Camilli 2002; Pinas et al. 2008; Cortes et al. 2015)
13	<i>blpRH, 486</i>	- Modula la expresión de bacteriocinas del tipo BlpC.	(Kjos et al. 2016)
14	<i>ritR, 489</i>	- En modelos de neumonía, la mutante que carece de este regulador de respuesta mostró una disminución en la virulencia. - Regulador del sistema de captación de hierro <i>piu</i> , actuando como represor. - Estrés oxidativo.	(Glanville et al. 2018)

Continúa en la página siguiente

Tabla 1. Resumen de los TCS presentes en *Streptococcus pneumoniae*. El genoma de neumococo alberga 13 TCS y un RR de respuesta huérfano. En la primera columna se encuentra el número asignado a cada TCS, mientras que en la segunda columna están anotados los distintos nombres dados a cada uno de ellos. En la tercera columna se enumeran las principales funciones y fenotipos encontrados para cada TCS.

Competencia

S. pneumoniae es una bacteria naturalmente competente, es decir que genera un estado permisivo y altamente regulado que posibilita la captación de ADN para contribuir a su diversidad genética (Claverys and Havarstein 2002). La inducción de competencia para la transformación genética natural se encuentra regulada por un mecanismo de *quorum sensing*, que involucra al TCS ComDE, al péptido estimulante de la competencia (**CSP: Competence-Stimulating Peptide**) y a un sistema transportador del tipo ABC llamado ComAB. CSP es producido a partir de un pre-péptido codificado por el gen *comC*, exportado por el transportador ComAB y parcialmente hidrolizado para generar el

péptido maduro denominado CSP. Una vez alcanzada una concentración crítica de CSP en el medio extracelular, el mismo interacciona con el receptor ComD, que actúa como HK. Esta interacción genera la autofosforilación de ComD y la posterior transferencia del grupo fosfato al residuo aspartato en la posición 58 del regulador ComE. Este RR fosforilado activa la transcripción de genes tempranos de competencia, tales como los operones *comCDE* y *comAB*, y se produce una retroalimentación positiva en respuesta al incremento en los niveles de CSP, que promueve el desarrollo sincronizado de competencia en la población. Asimismo, la fosforilación de ComE induce la expresión del gen *comX* que codifica un factor sigma alternativo, ComX, el cual estimula la expresión de un grupo de genes tardíos, entre los que se encuentran aquellos requeridos para la captación y recombinación del ADN (Li et al. 2001; Claverys and Havarstein 2002; Pinas et al. 2008; Cortes et al. 2015; Gomez-Mejia, Gamez, and Hammerschmidt 2018).

Entre los genes inducidos por CSP relacionados a virulencia se encuentran *lytA*, *htrA* y *cbpD* que codifican para la autolisina principal, una proteasa de respuesta al estrés y una proteína de competencia, respectivamente (Guiral et al. 2005; Laux et al. 2015; Mortier-Barriere et al. 1998; Peterson et al. 2004; Zhu and Lau 2011).

El estado de competencia es un proceso altamente regulado en neumococo: mientras ComDE lo regula positivamente, el TCS denominado CiaRH lo inhibe. Si bien se ha descrito que CiaR no interactúa directamente con ningún *loci* relacionado con competencia, diversas teorías se han propuesto para explicar el efecto indirecto que ejerce en la expresión de genes relacionados con competencia. CiaR induce la expresión del factor de virulencia HtrA, una proteasa que se ha vinculado con la represión de la competencia, probablemente mediante la degradación de CSP (Stevens et al. 2011; Cassone et al. 2012). Adicionalmente, CiaR regula la expresión de 5 ARN no codificantes (denominados csRNAs, por sus siglas en inglés "*cia-dependent small RNAs*"), que modulan el proceso de competencia al interactuar e inhibir la expresión del gen *comC* (Laux et al. 2015).

Autólisis

En bacterias, la autólisis es uno de los mecanismos más conocidos de muerte celular programada, formando parte de diversos procesos fisiológicos bacterianos, entre los que se encuentra el desarrollo de competencia natural. Este mecanismo de lisis se desencadena por una autodigestión de la pared celular llevada a cabo por hidrolasas de peptidoglicano. En *S. pneumoniae*, *LytA* es la autolisina principal y está codificada por el gen *lytA*, que se encuentra en el mismo operón que *recA*. El gen *recA* codifica una proteína responsable de la recombinación homóloga de ADN exógeno.

Curiosamente, el operón *cinA-recA-dinF-lytA* está regulado por el sistema de transducción de señales ComDE (Mortier-Barriere et al. 1998).

La activación de LytA puede inducirse por mecanismos independientes a la competencia. Un ejemplo de ello es la inducción de autólisis por antibióticos, muy conocida dada su importancia clínica (Mascher et al. 2006). En nuestro laboratorio se ha demostrado que el estrés ácido también es un inductor de lisis en neumococo. Este fenómeno es controlado por ComE en su estado fosforilado, pero a través de una señalización distinta a la que regula el estado de competencia. La autólisis por estrés ácido (ASIL) es independiente de la activación por CSP, ComD y del factor de competencia tardío ComX. Esto sugiere que existiría una nueva cascada de señalización en la que ComE estaría involucrada. Asimismo, se pudo determinar que CiaRH ejerce un rol protector frente a la autólisis tanto a pH alcalino como a pH ácido, independientemente de la activación mediada por ComE (Pinas et al. 2008).

Respuesta de Tolerancia al Estrés Ácido

Muchas bacterias patógenas son capaces de sobrevivir en ambientes con condiciones de pH bastante bajas. El mecanismo que permite que estas bacterias se adapten a estos entornos ácidos se denomina Respuesta de Tolerancia al Estrés Ácido (ATR, por sus siglas en inglés). Este fenómeno se produce cuando las células bacterianas se exponen inicialmente a un pH subletal generando una adaptación fisiológica que permite la supervivencia de neumococo a pH más bajos (Cotter and Hill 2003). A lo largo del todo el proceso patogénico, estas bacterias pueden encontrar distintos entornos ácidos dentro de su hospedador. Una vez que son internalizadas dentro de la célula hospedadora, muchas bacterias han desarrollado diversos mecanismos que les permiten sobrevivir e incluso poder replicar en compartimentos intracelulares acídicos, donde el pH puede variar de 4 a 6 (Clemens 1996; Glomski et al. 2002; Tranchemontagne et al. 2016; von Bargen, Gorvel, and Salcedo 2012; Carayol and Tran Van Nhieu 2013; Figueira and Holden 2012). En *S. pneumoniae* se ha demostrado que CiaR participa en el mecanismo de ATR, ya que mutantes que carecen de este TCS presentan una sensibilidad incrementada a pH ácido. Por lo tanto, este sistema de señalización favorece el desarrollo de ATR (Cortes et al. 2015; Pinas et al. 2008).

Serín-treonín quinasa (StkP)

En eucariotas, existe una gran familia de serín-treonín quinasa que participan en diversas vías de señalización. Estas proteínas también se encuentran presentes en bacterias, donde desempeñan

un papel clave en varios procesos celulares, tales como el metabolismo central o secundario, desarrollo, división celular y virulencia. *S. pneumoniae* presenta una única serín-treonín quinasa, StkP, una proteína de membrana compuesta por un dominio quinasa N-terminal que se enfrenta al citoplasma, una región transmembrana corta y una región C-terminal extracelular que contiene cuatro dominios PASTA (proteína de unión a penicilina y proteína Ser/Thr asociada a quinasa). La comparación del perfil de expresión global de las cepas de tipo salvaje con la mutante Δ *stkP* ha revelado que la transcripción de los genes implicados en el metabolismo de la pared celular, la biosíntesis de pirimidina, la reparación del ADN, la captación de hierro y la respuesta al estrés oxidativo están controladas por StkP, lo que explica los efectos pleiotrópicos encontrados en la mutantes nulas para *stkP* (Saskova et al. 2007). También se ha descrito que StkP fosforila varias proteínas, principalmente en residuos de treonina, siendo esenciales los dominios PASTA para la actividad de la quinasa. La fosforilación en los residuos de serina en proteínas de neumococo parece ser independiente de StkP. Un exhaustivo análisis por microscopía de inmunofluorescencia de células neumocócicas, mostró que StkP colocaliza con proteínas del divisoma, sugiriendo que StkP contribuye al mecanismo de división celular (Beilharz et al. 2012; Perez et al. 2019). De hecho, la mutante *stkP* muestra defectos morfológicos y de crecimiento, alteraciones en la división celular, aumento de la autólisis dependiente de LytA (inducida por antibióticos o por un crecimiento a un pH alcalino de 7,8), tolerancia reducida a las condiciones de estrés (incluido el estrés ácido) y media la adherencia a células endoteliales (Grangeasse 2016). StkP también es esencial para la virulencia, siendo necesario para la infección pulmonar y para invadir y diseminarse en el torrente sanguíneo de ratones infectados por vía intranasal (Echenique et al. 2004).

3-Interacción de Neumococo con el hospedador

S. pneumoniae ha evolucionado para colonizar las superficies mucosas del tracto superior del aparato respiratorio humano, a partir del cual puede diseminarse a otro hospedador o bien migrar a otras áreas del organismo y causar enfermedad. Para poder lograr una colonización exitosa y una eventual invasión a otros órganos, el neumococo tiene que lidiar con distintas barreras de defensa del hospedador. Para ello, debe interactuar con la microbiota de la nasofaringe y prevalecer por sobre las bacterias que compiten con ella, evadir y utilizar la respuesta inmune para su mecanismo de patogénesis, traspasar barreras físicas y adaptarse a distintos nichos. Una etapa clave, tanto para la colonización como para la infección, es la invasión de las células hospedadoras. Dicho proceso consta de diversas etapas, empezando por la adherencia de la bacteria a la célula. El neumococo se une con avidéz a células epiteliales tanto de nasofaringe como de pulmón, así como a células endoteliales periféricas y de la microvasculatura cerebral (Weiser, Ferreira, and Paton 2018).

Mecanismos de Adhesión del Neumococo

La cápsula de neumococo resulta ventajosa para evadir las barreras del hospedador y alcanzar la mucosa respiratoria. Sin embargo, representa una desventaja para la invasión a la célula hospedadora, ya que la cubierta de polisacáridos oculta los sitios de unión al epitelio (Kjos et al. 2015). Para lograr una infección exitosa, la bacteria modula sus propiedades de unión al entorno a través de un proceso llamado variación de fase. Durante el proceso de colonización, la cápsula, dada su alta densidad de carga negativa, evita ser atrapada por la mucosidad del aparato respiratorio. Una vez que alcanza el epitelio, la bacteria disminuye la expresión de su gruesa cápsula promoviendo así la adhesión a glicoconjugados presentes en la mucosa respiratoria (Cundell et al. 1995). El neumococo expresa hasta 10 glicosidasas. Algunas han demostrado ser importantes para la adhesión de la bacteria al escindir los ácidos siálicos presentes en mucinas, glicolípidos y glicoproteínas, exponiendo los receptores celulares que intervienen en la adherencia (King, Hippe, and Weiser 2006). Además, se ha descrito que tanto la neuraminidasa A (NanA) y la β -galactosidasa (BgaA), tienen dominios tipo lectinas y parecen funcionar como adhesinas, independientemente de su actividad enzimática (Brittan et al. 2012; Uchiyama et al. 2009). Por otra parte, el ácido siálico que es liberado por la acción de las principales neuraminidasas (NanA y NanB) sirve como fuente de carbono para el metabolismo bacteriano, hecho que ratifica la predilección de neumococo por colonizar nichos ricos en mucina (Burnaugh, Frantz, and King 2008).

Diversas adhesinas asociadas a la pared celular bacteriana median la adherencia a las células epiteliales. Por ejemplo, las adhesinas asociadas a pared PavA y PavB y la enolasa Eno se unen a proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y plasminógeno respectivamente (Holmes et al. 2001; Pracht et al. 2005; Zakrzewicz et al. 2016). Una de las más estudiadas es la fosforilcolina (PCho), la cual está presente en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular bacteriana. Dicha molécula posee homología estructural con el Factor Activador de Plaquetas (PAF), por lo que es reconocida por el receptor de PAF (rPAF). Mediante la unión de PCho a rPAF, neumococo puede ingresar a la célula siguiendo la vía de reciclaje del receptor. La proteína asociada a colina CbpA (también denominada PspC) interactúa con el llamado componente secretor del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) (Asmat et al. 2014). Además, PspC une ácido siálico y lacto-N-tetrosa de la superficie de células epiteliales respiratorias, lo que facilita la colonización (Rosenow et al. 1997). Después de la adhesión a la célula hospedadora, el neumococo utiliza la vía de reciclaje de pIgR, análoga a la vía del rPAF, para ser transportado entre las membranas apical y basal de la célula epitelial (Asmat et al. 2014).

Mecanismos de internalización a la célula

La membrana plasmática de las células eucariotas constituye un límite dinámico que separa el citoplasma del ambiente circundante. Mientras el transporte de moléculas simples se realiza a través de canales y de bombas incrustadas en la membrana, la internalización de patógenos y de macromoléculas requiere de procesos de mayor complejidad. Estos mecanismos comprenden la invaginación de la membrana y la formación de vesículas intracelulares, y son conocidos de manera genérica como endocitosis. Diversos tipos de endocitosis se han descrito en función del tamaño vesicular, el cargo que transportan y el mecanismo de formación de la vesícula: endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, macropinocitosis, fagocitosis y endocitosis independiente de clatrina y caveolina.

La fagocitosis se restringe a las “células fagocíticas profesionales”, como lo son los neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. En la fagocitosis se encuentran involucradas GTPasas de la familia Rho y otras moléculas de señalización activadas por receptores específicos de la superficie celular que estimulan la polimerización/despolimerización de actina. El proceso de internalización es mediado por actina, la cual genera protrusiones de ciertos dominios de la membrana plasmática, que posteriormente se fusionan para envolver al objeto fagocitado dentro una vesícula. Luego de la internalización, los patógenos son destruidos por medio de hidrolasas ácidas y proteasas lisosomales.

A diferencia de la fagocitosis, la endocitosis se desarrolla en todos los tipos celulares. Las principales formas de esta vía incluyen a la endocitosis mediada por clatrina y a la endocitosis mediada por caveolina. La primera es la principal vía endocítica en la mayoría de las células, y por lo tanto la mejor estudiada. Este proceso se inicia mediante el reconocimiento de un ligando específico por un determinado receptor y comprende la formación de vesículas rodeadas por una cubierta poliédrica de clatrina. Estos complejos de cubierta se ensamblan en estrecha asociación con la membrana plasmática formando un andamio rígido y curvado. Finalmente, la GTPasa denominada dinamina escinde la vesícula endocítica de la membrana plasmática. Muchos patógenos utilizan tanto la endocitosis mediada por clatrina como la endocitosis mediada por caveolina (Cossart and Helenius 2014; Veiga and Cossart 2006).

En las células eucariotas, las Rab GTPasas son proteínas fundamentales para la organización, el mantenimiento y la dinámica del sistema de endomembranas, funcionando como reguladoras de las vías específicas de transporte de membrana (Agola et al. 2011; Hutagalung and Novick 2011). En las infecciones bacterianas, las proteínas Rab desempeñan una función esencial en la inmunidad del hospedador, internalización por endocitosis o fagocitosis y direccionamiento del transporte de los patógenos fagocitados hacia los lisosomas para su degradación. Comúnmente, el tráfico de las vacuolas que contienen a los patógenos, está mediado por numerosas proteínas Rab que dirigen el transporte desde una vesícula endocítica temprana (Rab-5 positivas) hacia un compartimiento tardío (Rab-7 positivo). Finalmente, los patógenos destinados a la degradación son transportados hacia el compartimiento lisosomal.

Internalización del neumococo

El traspaso de la barrera epitelial del aparato respiratorio es una etapa muy importante en el mecanismo patogénico de neumococo para producir infecciones invasivas. Esta bacteria es capaz de desplegar un amplio abanico de estrategias para poder lograr su objetivo e introducirse dentro del sistema vascular. Por un lado, la inducción de una respuesta inflamatoria produce la disrupción del epitelio pulmonar, a la vez que la expresión de factores de virulencia como neumolisina (Ply) y una piruvato oxidasa productora de H_2O_2 (SpxB), inducen daño celular (Rai et al. 2015; Surve et al. 2018). Por otro lado, la internalización de neumococo en células epiteliales respiratorias y en células endoteliales, permiten el desarrollo de infecciones invasivas como por ejemplo la infección de las meninges (Weiser, Ferreira, and Paton 2018).

Se han descrito diferentes mecanismos por los cuales *S. pneumoniae* es internalizado. Luego de la unión de la bacteria a rPAF, se induce la endocitosis mediada por clatrina, la cual es activada por la proteína β -arrestina (Radin et al. 2005). Para contrarrestar el avance de la bacteria hacia el sistema circulatorio, el hospedador promueve una respuesta innata inducida por interferón tipo I, en la cual se produce una disminución de la expresión de receptores celulares como rPAF y el aumento de la expresión de proteínas de uniones estrechas entre las células. Además, se ha caracterizado una vía de ingreso que se produce mediante la unión de PspC (CbpA) y pIgR, proceso que puede estar mediado por mecanismos dependientes de clatrina o de caveolina (Asmat et al. 2014).

En estadios tempranos de internalización, el neumococo se encuentra en endosomas tempranos colocalizando con un marcador de estas vesículas, Rab5. A partir de este punto, la bacteria puede seguir distintos destinos dentro de la célula. Una vía que conduce a la muerte del patógeno es la maduración de los endosomas tempranos a endosomas tardíos (Rab7 positivos) y la posterior fusión con vesículas lisosomales. Por otro lado, la bacteria puede ser liberada de la célula ya sea por un mecanismo de transcitosis hacia la cara basolateral o bien a través de endosomas de reciclaje hacia la cara luminal de la célula (Asmat et al. 2014). Además, recientemente, se describió que la bacteria puede ser reclutada a la vía autofágica, la cual en última instancia se fusiona con lisosomas produciendo su muerte, o bien puede escapar hacia el citoplasma sobreviviendo la muerte mediada por ubiquitinación (Ogawa et al. 2018; Surve et al. 2018).

Autofagia y Xenofagia

La autofagia es un proceso catabólico muy conservado en organismos eucariotas superiores, que consiste en por lo menos tres vías distintas: microautofagia, autofagia asociada a chaperonas y macroautofagia. La macroautofagia, o simplemente autofagia, involucra la formación de vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas, que secuestran distintos cargos y los conducen hacia la degradación lisosomal. La autofagia basal es crucial para el mantenimiento de la homeostasis celular debido a que constantemente se encuentra removiendo organelas dañadas, agregados de proteínas y proteínas con una larga vida media. La autofagia puede ser inducida en respuesta a diversas situaciones de estrés celular como la carencia de nutrientes, estrés oxidativo, radiación, hipoxia, e inclusive la infección con patógenos (Gomes and Dikic 2014; Kwon and Song 2018; Schmid and Munz 2007).

Inicialmente, se caracterizó a esta vía como un proceso no selectivo que degradaba distintos componentes citosólicos para la obtención de energía. Sin embargo, en los últimos años se ha

demostrado que la autofagia es un proceso selectivo que requiere la participación de receptores específicos. Según el blanco que cada receptor detecta, la autofagia se puede subdividir en distintas clases: agregofagia (agregados proteicos), lisofagia (lisosomas), mitofagia (mitocondrias), pexofagia (peroxisomas), xenofagia (patógenos) y lipofagia (lípidos) (Gomes and Dikic 2014; Schulze, Sathyanarayan, and Mashek 2017).

La autofagia se inicia con la formación de un fagóforo, también llamado membrana de aislamiento. Este fagóforo proviene de membranas del retículo endoplasmático (ER) y de las mitocondrias, en particular membranas del ER asociadas a mitocondrias. Esta estructura se expande, debido a la fusión con membranas provenientes de distintas fuentes como el aparato de Golgi y endosomas de reciclaje, envolviendo su material cargo hasta su cierre final que resulta en una vesícula de doble membrana (Gomes and Dikic 2014).

Desde su origen hasta su fusión final con los lisosomas, la vía autofágica se encuentra estrictamente regulada por proteínas denominadas ATG (relacionadas a autofagia). Cuatro complejos proteicos que involucran distintas ATG, son esenciales para la formación del autofagosoma. El primer complejo involucrado, que comprende a las proteínas ULK, FIP200, ATG13 y ATG101, recibe señales directas de inhibición por parte del receptor mamífero de rapamicina (mTOR) y de activación por parte de la quinasa AMPK (Grasso, Renna, and Vaccaro 2018; Kim et al. 2011). Este complejo, una vez activado, tiene la capacidad de fosforilar y activar a otros miembros involucrados en el proceso de biogénesis. El segundo complejo consta de las proteínas VPS34 (una fosfatidil-inositol-3-quinasa de clase III: PI3KCIII), BECLIN-1, VPS15 y ATG14. Dicho complejo marca las membranas para ser utilizadas en la biogénesis de la vesícula, al concentrar en ellas fosfatidil-inositol 3-fosfato (PI3P) que actúa como señal para la nucleación de otras ATG. Dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina, ATG12-ATG5 y ATG8, desempeñan un rol crucial para la elongación y posterior cierre de la vesícula. ATG8 fue descubierta en levaduras, pero se han encontrado varios homólogos en mamíferos llamados MAPLC3 (o simplemente LC3, del inglés *microtubule-associated protein light chain 3*) y GABARAP (proteína asociada al receptor de GABA). La proteína soluble LC3 se distribuye inicialmente en el citosol. Después de ser escindida por la proteasa ATG4, LC3 se convierte en LC3-I, que posteriormente se conjuga con fosfatidiletanolamina en la superficie de la membrana autofagosomal para formar LC3-fosfatidiletanolamina o LC3-II a través de una reacción mediada por los complejos ATG12-ATG5-ATG16. LC3-II es requerida para el cierre de la membrana de aislamiento y la fusión de los autofagosomas con los lisosomas (Gomes and Dikic 2014; Schaaf et al. 2016).

Como se nombró anteriormente, la xenofagia es una vía selectiva que señala patógenos para su posterior degradación. Por lo general los receptores involucrados en su reconocimiento poseen un dominio LIR (dominio de interacción con LC3) y un dominio de unión a ubiquitina (Kirkin et al. 2009; Birgisdottir, Lamark, and Johansen 2013). La ubiquitinación de bacterias internalizadas es un evento que por lo general precede y es necesario para el desarrollo de la xenofagia.

Como es de esperar, algunos patógenos han evolucionado diversas estrategias para evadir esta respuesta celular innata y otros para aprovecharse de la disrupción del flujo xenofágico que ellos mismos ocasionan. Por ejemplo, *Salmonella* o *Mycobacterium* bloquean la maduración del autofagosoma para poder sobrevivir y dividirse dentro de este compartimento. Alternativamente, otras bacterias como *Shigella flexneri* y *Listeria monocytogenes* pueden escapar hacia el citosol, donde son capaces de multiplicarse (Gomes and Dikic 2014; Kwon and Song 2018; Khandia et al. 2019).

Rol de la xenofagia en la vida intracelular del neumococo

Hasta hace unos años, el conocimiento que se tenía acerca del rol que cumple la autofagia en la sobrevida intracelular de neumococo era muy escaso. Una publicación relativamente reciente reportó que la infección de células epiteliales de pulmón con *S. pneumoniae* producía la inducción del proceso autofágico, debido a la inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Li et al. 2015). Sin embargo, la participación de la xenofagia en la sobrevida de esta bacteria ha sido dilucidada recientemente en modelos de células endoteliales y epiteliales (Ogawa et al. 2018; Surve et al. 2018).

Como se mencionó anteriormente, el neumococo ingresa a la célula hospedadora por medio de endocitosis y su destino final está gobernado por diversos factores, tantos celulares como bacterianos. El factor de virulencia Ply (o neumolisina), parece tener una función primordial en este sentido, al producir daño en la membrana de la vesícula que contiene neumococo (denominada PCV, del inglés *pneumococcus containing vesicle*) (Ogawa et al. 2018; Surve et al. 2018). Esto lleva a la ruptura de la vesícula y al reclutamiento de señales de daño como son las Galectinas 3 y 8, así como a la ubiquitinación de la bacteria. La deposición de ubiquitina sobre la pared celular bacteriana es fundamental para que la bacteria sea conducida a la formación de una vesícula autofágica denominada PaCV (del inglés *pneumococcus-containing autophagic vesicle*), o bien, hacia su degradación por el complejo proteosomal. Como se mencionó anteriormente, la selectividad del proceso xenofágico es mediado por unas proteínas receptoras que reconocen a un determinado patógeno. Estos receptores, en general, poseen un dominio de unión a ubiquitina y un dominio de

unión a LC3. Dos proteínas cumplen la función de reconocer a neumococo ubiquitinado para dirigirlo hacia el autofagosoma: NDP52 y p62 (también conocida como SQSTM1). Proteínas como Rab41 contribuyen a la formación de PaCV. Un factor del hospedador que es esencial tanto para la biogénesis como la posterior fusión con los lisosomas es la enzima Nedd4-1, perteneciente a la familia de ligasas E3 del sistema de poli-ubiquitinación. De esta manera, la autofagia provee un mecanismo de eliminación intracelular de neumococo (Ogawa et al. 2018; Surve et al. 2018).

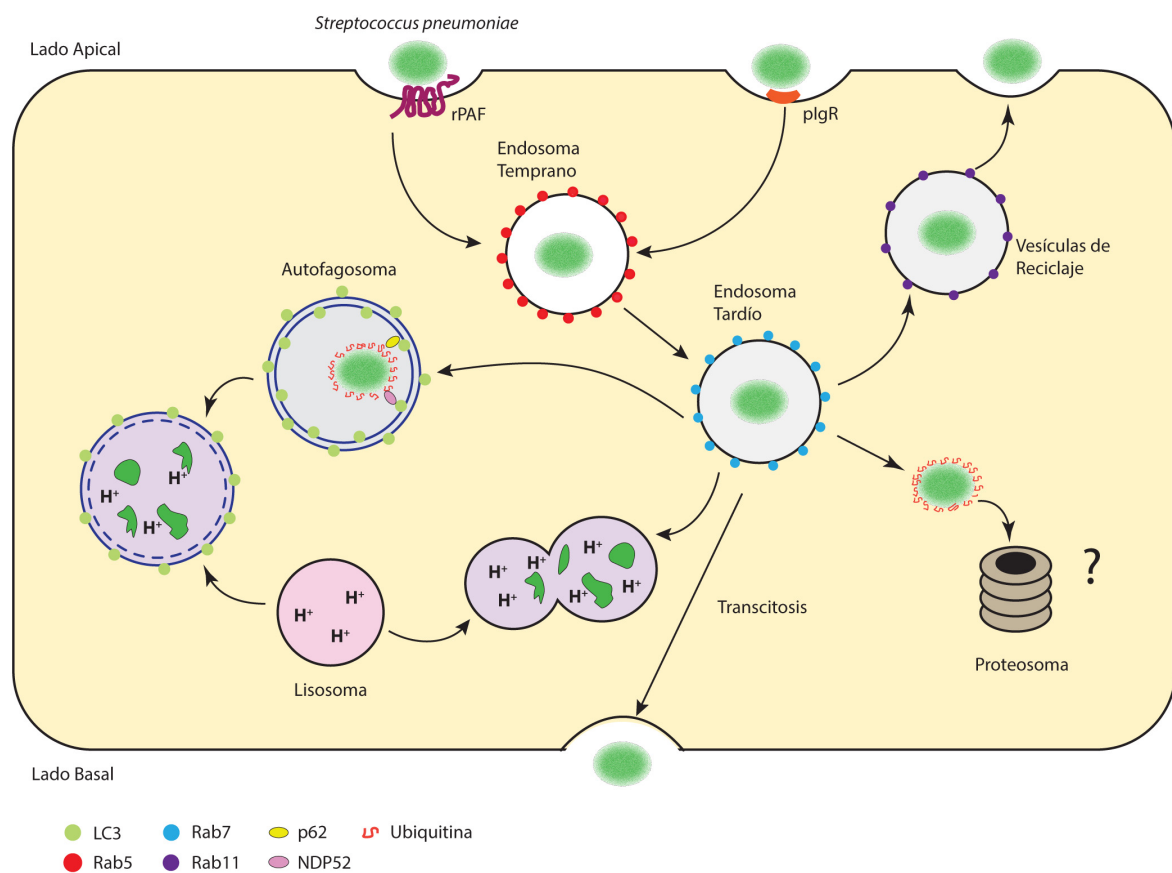


Figura 4. Etapa intracelular de Neumococo. *S. pneumoniae* es capaz de adherirse a las células mediante la interacción de receptores celulares específicos y moléculas de superficie bacterianas que son análogos a sus ligandos fisiológicos. Luego de este primer contacto, la bacteria es internalizada mediante un mecanismo de endocitosis mediado por clatrina. Una vez en el interior celular, la bacteria puede sufrir varios destinos. Los endosomas tardíos pueden fusionarse con las vesículas lisosomales, causando la muerte del patógeno, o bien seguir la vía de reciclaje, expulsando la bacteria de nuevo hacia la cara apical. Además, puede ser liberada en la cara basal mediante un mecanismo denominado transcitosis. Esta bacteria, por otra parte, es capaz de producir el daño de la membrana vesicular. Esta acción resulta en la liberación del patógeno y la marcación de su superficie con ubiquitina, lo que conduce a la bacteria hacia vesículas autofágicas (o xenofágicas) provocando en última instancia su muerte al fusionarse con los lisosomas. Por otro lado, hay indicios de que la eliminación del patógeno también ocurre a expensas del complejo proteosomal.

4- El virus influenza

El término influenza deriva de la palabra italiana “*influentia*”, debido a que a mediados de 1300 se consideraba que la gripe era resultado de influencias astrológicas. Sin embargo, la etiología de la enfermedad y la explicación de su comportamiento peculiar, permanecieron esquivas durante varios años. Ya en el siglo XIX, se pensaba que la gripe ocurría debido a una infección bacteriana con *Haemophilus influenzae*. No fue hasta 1931, cuando Richard Shope mostró que la gripe porcina podía ser transmitida a partir de moco filtrado, lo cual indicaba que el agente causante era un virus y no una bacteria (Shope 1931). Años más tarde, Hoyle y colaboradores aislaron el virus influenza, agente etiológico de la gripe humana (Hoyle and Fairbrother 1937).

Clasificación de los virus influenza

Los virus influenza son miembros de la familia Orthomyxoviridae, la cual está constituida por los virus de influenza A, B y C, *Thogotovirus* e *Isavirus*. Esta familia se posiciona dentro del Grupo V según la clasificación de Baltimore; es decir, su genoma consta de cadenas simples de ARN de polaridad negativa. Además, estos virus presentan una ribonucleocápside helicoidal (también llamada vRNP por ribonucleoproteína viral) y se encuentran rodeados por una envoltura lipídica que proviene de la célula hospedadora enriquecida por proteínas virales, tales como neuraminidasa y hemaglutinina (Krammer et al. 2018). En particular, en esta familia, los virus de la influenza A (IAV) e influenza B (IBV) son los más relevantes para la salud humana.

En base a diferencias antigénicas en las proteínas de matriz y las nucleoproteínas, se pueden distinguir, hasta el momento, 4 géneros distintos de virus de la influenza: A, B, C y D. Los primeros dos serotipos son los que revisten mayor relevancia para la salud humana. IAV e IBV son los responsables de epidemias y pandemias, mientras que ICV produce enfermedades de manera esporádica. El virus de la influenza D (IDV) se ha descubierto hace poco y sólo causaría enfermedad en animales (Su et al. 2017).

IAV se subclasifica en base a variaciones en la antigenicidad de dos de sus proteínas más expuestas, que son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Actualmente se conocen 16 subtipos de HA y 9 de NA (Krammer et al. 2018; Dugan et al. 2008; Wu et al. 2014). Estos serotipos se han identificado entre los diferentes IAV que infectan su reservorio principal: las aves. En contraste, los virus tipo B y C no se dividen en subtipos y sólo su único reservorio es el humano. Los

virus tipo D son los últimos identificados y su aislamiento se produjo a partir de ganado bovino y porcino enfermo. Revisten de interés por su potencial zoonótico.

Epidemiología

IAV e IBV son los agentes etiológicos de las epidemias anuales de gripe alrededor del mundo. En principio todos los grupos etarios son susceptibles a estos virus, aunque el riesgo de enfermedad severa incrementa en niños menores de 5 años, adultos mayores de 65 años, mujeres embarazadas, así como también pacientes con enfermedades crónicas e inmunosuprimidos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que anualmente la epidemia de gripe estacional resulta en mil millones de infecciones, de 3 a 5 millones en casos de enfermedad severa y alrededor de 500.000 muertes (Krammer et al. 2018).

Actualmente se encuentran circulando en la población humana las cepas H₁N₁ y H₃N₂ de IAV en conjunto con IBV, y son las causantes de la gripe estacional. Su alta tasa de mutación conduce a una rápida evolución viral. Esto explica la necesidad de implementar campañas anuales de prevención mediante vacunas, principalmente en las poblaciones de riesgo y en los profesionales del ámbito de la salud. Pero estos subtipos no siempre fueron los causantes de enfermedad humana. La introducción de una nueva cepa sucede cuando virus de tipo A provenientes desde fuentes aviares o porcinas adquieren la capacidad de infectar y de transmitirse entre humanos. Cuando esto sucede, se produce una pandemia debido a la falta de inmunidad de la población contra este nuevo virus. Subsecuentemente estas cepas se convierten en las causantes de gripe estacional.

Desde 1918, cuatro grandes pandemias se han asociado con el virus de la Influenza. La primera de ellas corresponde a la llamada “pandemia de gripe española de 1918” y el agente etiológico fue un IAV tipo H₁N₁. Se estima que causó alrededor de 50 millones de muertes en todo el mundo, convirtiéndose en la pandemia más devastadora de la historia reciente. La segunda se produjo entre los años 1957 y 1958, cuando un virus H₂N₂ de origen aviar desplazó a la cepa circulante, resultando en alrededor de 2 millones de casos mortales. Entre 1968 y 1969 se inició una nueva pandemia, siendo el protagonista otro virus de origen aviar, pero esta vez de subtipo H₃N₂. En 1977 un nuevo virus de tipo H₁N₁ empezó a circular en la población humana pero no fue capaz de desplazar a la cepa anterior. Desde ese momento ambas cepas circulan conjuntamente. La última gran pandemia resulta ser la primera de este milenio: en 2009 emergió, en América del Norte, un nuevo virus H₁N₁ de origen porcino denominado virus de la influenza A H₁N₁.pdm2009, causante de un gran número de muertes y que todavía produce enfermedad estacional (Morris, Cleary, and Clarke 2017).

Infecciones en humanos con IAV aviáres como H₅N₁ y H₇N₉, así como la cepa H₃N₂ de origen porcino se producen en distintas regiones del planeta, aunque sin transmisión entre humanos. Esto indica que estas clases de virus necesitan nuevas adaptaciones para poder propagarse en el ser humano. El número de modificaciones necesarias para que esto suceda no está claro, sin embargo, basado en modelos animales, se estima que estos virus pueden requerir pocas (Krammer et al. 2018).

Genoma viral de influenza A

El genoma de IAV se compone de 8 segmentos y contiene aproximadamente 14.000 nucleótidos. Los segmentos están compuestos de ARN lineal simple cadena de sentido negativo y contiene de 10 a 11 marcos de lectura abiertos (ORFs). Cada segmento viral y sus correspondientes productos, se encuentran resumidos en la siguiente tabla 2:

<i>Segmentos de ARN viral y sus productos</i>	
Segmento ARN (N° de nucleótidos)	Producto (N° de aminoácidos)
1 (2341)	Polimerasa PB2 (759)
2 (2341)	Polimerasa PB1 (757)
	PB1-F2 (90)
	PB1-N40 (717)
3 (2233)	Polimerasa PA (716)
	PA-X (61)
	PA-N155 (561)
	PA-N182 (534)
4 (1778)	Hemaglutinina (566)
5 (1565)	Nucleoproteína (498)
6 (1433)	Neuraminidasa (454)
7 (1027)	Proteína de Matriz M1 (252)
	Proteína de Matriz M2 (97)
8 (890)	Proteína No estructural NS1 (230)
	Proteína Exportadora Nuclear NEP o NS2 (121)

Tabla 2. Resumen de los componentes estructurales y no estructurales de IAV. IAV posee 8 segmentos de ARN lineales, a partir de los cuales se codifican 14 productos distintos. En esta tabla se resume los distintos segmentos del genoma viral y cuales son las principales proteínas codificadas a partir de cada uno de ellos.

Estructura del virión de influenza A

La bicapa lipídica es la capa más externa o envoltura del virión y está constituida por una estructura tipo mosaico presentando microdominios enriquecidos en colesterol. En ella se encuentran embebidas las proteínas transmembranas: HA (hemaglutinina), NA (neuraminidasa) y M2 (canal de protones). HA es la proteína principal de la envoltura (~80%) y forma trímeros en la superficie, albergando sitios de unión al receptor y epítopes reconocidos por anticuerpos neutralizantes. La HA es sintetizada en la célula infectada como una única cadena polipeptídica (HA₀), que posteriormente es escindida por proteasas en dos subunidades, HA₁ y HA₂. Las dos subunidades se mantienen covalentemente unidas mediante enlaces disulfuro en la superficie de la partícula viral. El nuevo extremo amino(N)-terminal de HA₂, que se produce por la escisión, contiene una secuencia de aminoácidos hidrófobos llamada péptido de fusión (Chaipan et al. 2009; Lazarowitz, Compans, and Choppin 1973; Nayak et al. 2009). Durante la entrada del virus a las células, el péptido de fusión se inserta en la membrana endosomal provocando la fusión de las membranas viral y celular, y es por esta razón que el clivaje proteolítico es esencial para la infectividad del virus.

La segunda proteína en abundancia en esta envoltura externa es la neuraminidasa (NA). Posee un rol fundamental en el ciclo viral, ya que su actividad enzimática es crucial para la liberación de nuevas partículas virales producidas en una célula infectada y por ende también lo es para la transmisión y propagación del virus. Esta proteína forma homo-tetrámeros y produce la eliminación del ácido siálico presente en las glicoproteínas celulares (Shtyrya, Mochalova, and Bovin 2009). Algunos fármacos antivirales, como oseltamivir y zanamivir, son homólogos estructurales del ácido siálico, por lo que generan una inhibición competitiva del sitio activo de la enzima, produciendo la acumulación viral dentro de la célula (Shtyrya, Mochalova, and Bovin 2009).

Por último, la proteína menos abundante en esta capa del virión es un canal de protones denominado proteína de matriz 2 (M2). Esta proteína juega un papel clave en las primeras etapas de infección, ya que participa en la liberación del material genético viral dentro de la célula. M2 media la acidificación del virión y por lo tanto produce un debilitamiento de la matriz viral y de la interacción de las ribonucleoproteínas virales (vRNPs) con la proteína de matriz M1. Aunque el rol de M2 no está limitado solamente a esta función: se ha descrito que produce alteraciones en los sistemas de transporte de membrana debido a su actividad como canal iónico. Además, genera alteraciones celulares que son independientes de esta actividad, como es la inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Manzoor, Igarashi, and Takada 2017).

Por debajo de esta membrana lipídica se halla la matriz viral constituida por M1. Dicha cubierta aporta rigidez y fuerza a la envoltura, a la vez que interactúa con los vRNPs.

La estructura central del virus consiste en vRNPs helicoidales que contienen ARN cadena negativa y nucleoproteínas (NP), junto con pequeñas cantidades de la proteína de exportación nuclear (NEP) y tres polimerasas (PB1, PB2, PA) que forman el complejo de la ARN polimerasa viral.

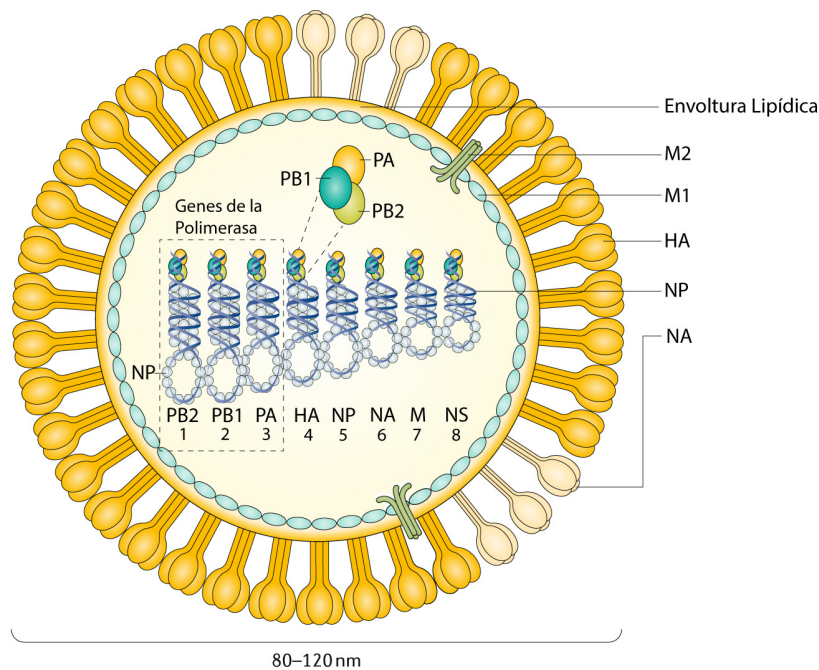


Figura 5. Estructura del virus influenza A humano. El genoma de IAV consiste en 8 segmentos de ARN que codifican hasta 15 proteínas. El complejo polimerasa está formado por PB2, PB1 y PA, codificadas en los segmentos 1, 2 y 3, respectivamente. El segmento 2 codifica para dos proteínas adicionales, PB1-N40, de función desconocida, y PB1-F2, con propiedades pro-apoptóticas. A partir del segmento 3 se expresan las proteínas PA-X, PA-N155 y PA-N182. Además, las proteínas hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP) y neuraminidasa (NA) son codificadas en los segmentos 4, 5 y 6, respectivamente. El segmento 8 codifica para la Proteína Nuclear de Exportación (NEP; también conocida como NS2) y la proteína antagonista de la respuesta antiviral del hospedador o proteína no-estructural 1 (NS1). La proteína de la matriz M1 y el canal iónico M2 son codificadas por el segmento 7. Dentro del virión, cada uno de los ocho segmentos forma una ribonucleoproteína (complejo RNP) donde el ARN viral se envuelve alrededor de NP, y se une al complejo de la polimerasa viral. (Adaptado de *Krammer F, 2018*).

Ciclo viral de influenza A

Al igual que todos los virus, la primera fase de la infección de IAV empieza mediante la interacción de la partícula viral con receptores celulares. El factor viral clave que posibilita esta adherencia es la

hemaglutinina mediante el reconocimiento de ácido siálico (SA) presente en las glicoproteínas que revisten las células. En general, las cepas de IAV humanos se unen preferentemente al ácido siálico terminal unido al residuo de galactosa en una conformación α -2,6; mientras que los IAV adaptados a aves poseen un receptor HA con unión específica para los residuos α -2,3. Esta diferencia de afinidad determina el tropismo de los diversos tipos de virus. La primera conformación (es decir α -2,6) es la principal forma encontrada en el aparato respiratorio humano, mientras que la segunda (α -2,3) predomina en el epitelio intestinal de las aves.

La internalización es mediada principalmente por endocitosis dependiente de clatrina, aunque se han descrito otras formas de entrada. La maduración de las vesículas endosomales es clave para este proceso. Al acidificarse este compartimento, se producen cambios estructurales en el virión que permitirán su fusión con la membrana y la liberación de su contenido genético hacia el citoplasma. Como se mencionó anteriormente, la glicoproteína HA es escindida por proteasas del hospedador generando una pequeña cola hidrofóbica denominada “péptido fusión”. Condiciones ácidas generan cambios conformacionales en la proteína HA que exponen a dicho péptido y de esta manera se induce la fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal (Blijleven et al. 2016; Stegmann 2000). El debilitamiento de la cápside y de la interacción entre vRNP y M1 permite la liberación de los segmentos de ARN. M2 cumple un rol clave dada su actividad de canal iónico.

La migración de los vRNPs hacia el núcleo es el paso siguiente y depende de la maquinaria celular y de vías de transporte. Se cree que la vía de importación nuclear constituida por Integrina- α -Integrina- β es la encargada de importar los distintos segmentos de ARNv al núcleo. Allí se produce tanto la replicación del ARNv, como la síntesis de ARN mensajero (ARNm). El proceso replicativo requiere la síntesis de ARN complementario que se usa como molde para la síntesis de nuevos segmentos de ARN de polaridad negativa (Dou et al. 2018; York et al. 2013). Por otro lado, la transcripción del ARNm es un proceso mucho más eficiente, dado que, a diferencia de la replicación, se lleva a cabo mediante el uso de una secuencia cebadora. Además, el complejo polimerasa viral es el encargado de proveer las modificaciones necesarias para que el ARNm sea estable. Este complejo, mediante un proceso denominado “*cap snatching*”, roba el capuchón 5' de los ARNm de la célula para luego insertarlo al ARNm viral (Dias et al. 2009; Dou et al. 2018). Finalmente, cada segmento es poliadenilado mediante un proceso de “tartamudeo” reiterativo, el cual ocurre cuando la polimerasa encuentra una secuencia de poli-U en la región 5' del ARNv (Poon et al. 1999). De esta forma, el virus interfiere con la síntesis de proteínas celulares en favor de la producción de los componentes virales. Los ARNm son transportados de vuelta al citosol para traducirse a proteínas (Dou et al. 2018).

El proceso de transducción depende enteramente de la maquinaria celular. Aquí existe una distinción entre dos grupos de mRNA. Las proteínas PB1, PB2, PA, M1, NP, NS1 y NEP son sintetizadas por ribosomas citosólicos, mientras que las proteínas de membrana HA, NA y M2 se producen en ribosomas asociados al retículo endoplásmico. El primer grupo es nuevamente reclutado hacia el núcleo, donde van a asistir a la replicación del genoma, a la formación de nuevas vRNP y a regular respuesta inmune celular. Por otro lado, las proteínas de membrana sufren modificaciones postraduccionales dentro del lumen del ER y transportadas primero al Golgi y luego hacia la membrana celular (Dou et al. 2018).

El acoplamiento de todos los componentes virales se realiza en regiones de la membrana plasmática enriquecidas en colesterol y esfingolípidos, conocidas como balsas lipídicas. Las proteínas estructurales que residen en el núcleo son exportadas de nuevo hacia el citoplasma y luego transportadas con la ayuda de la proteína Rab11 hacia la membrana plasmática. Una vez ensamblados todos los componentes se forman “brotes” en la membrana (por un mecanismo todavía desconocido). La liberación del virión se lleva a cabo gracias a la actividad sialidasa de NA, que lleva a cabo la hidrólisis de los ácidos siálicos unidos a glicoproteínas ancladas a la membrana plasmática celular. Esta acción previene la unión de HA a la superficie celular. Además, remueve los SA de los N-glicanos que se encuentran en la envoltura viral (Dou et al. 2018; Krammer et al. 2018).

IAV y autofagia

Como ya se describió anteriormente, en células infectadas por virus y bacterias, la inducción de la autofagia surge como un mecanismo de respuesta para controlar al patógeno. En consecuencia, algunos virus y bacterias han evolucionado de manera tal que son capaces de evadir y hasta de aprovecharse de esta vía para su propio beneficio. IAV no es la excepción, ya que la infección con IAV promueve la inducción de esta vía; de hecho, la sola expresión de la proteína M2 es suficiente para que se produzca este efecto (Gannage et al. 2009). Cabe señalar que diversos trabajos proponen que tanto NS1 como HA también activarían el flujo autofágico (Zhang et al. 2014; Zhirnov and Klenk 2013). Sin embargo, M2 no sólo es la responsable de la inducción, sino que es la misma proteína viral la que participa en el bloqueo de la fusión del autofagosoma con el lisosoma al interactuar con Beclin-1, evitando así la degradación lisosomal. Si bien es claro que IAV produce la disrupción del flujo autofágico, el impacto de esta perturbación en el mecanismo patogénico está siendo analizado.

Existe una discrepancia en si esta vía ejerce algún efecto sobre la replicación e infectividad viral. Mientras algunos trabajos describen que la alteración de la autofagia es crucial para la replicación y

la generación de progenie viral, otros modelos experimentales demuestran que este proceso es dispensable (Gannage et al. 2009; Zhou et al. 2009; Zhang et al. 2014; Perot et al. 2018). Por otro lado, existe una fina relación entre autofagia y apoptosis en células infectadas con IAV. La inducción de autofagia en estadios tempranos de infección protege a la célula de ser conducida a apoptosis (Gannage et al. 2009; Yeganeh et al. 2018). La inhibición de la apoptosis es importante para permitir el desarrollo de progenie viral. Por ende, es posible que el rol que ocupa la autofagia en el ciclo replicativo viral sea mediante la evasión de la muerte celular programada (Zhang et al. 2014).

Cabe destacar que M2 posee un dominio LIR (región de interacción con LC3) que le permite la unión directa con LC3. Esta interacción conduce a una relocalización de LC3 hacia la membrana plasmática donde se lleva a cabo la gemación de las partículas virales. LC3 resulta ser importante para la generación de partículas virales más estables (Beale et al. 2014).

Finalmente, la inducción de la autofagia en células infectadas con IAV conduce a la represión de genes involucrados en la respuesta inmune innata. Por ejemplo, la infección con IAV regula negativamente la expresión de genes inducidos por la vía de los interferones tipo I (Perot et al. 2018).

5-Coinfección con IAV y *Streptococcus pneumoniae*

Los virus de la influenza, al igual que otros virus respiratorios, tales como el virus respiratorio sincitial (VRS), virus parainfluenza, entre otros, son conocidos por predisponer a una infección secundaria bacteriana, también denominada superinfección (Bosch et al. 2013; Morris, Cleary, and Clarke 2017; Smith et al. 2013; Smith and McCullers 2014). De hecho, análisis retrospectivos de las principales pandemias producidas por virus de la gripe determinaron que la mayor cantidad de casos fatales se debieron a una infección bacteriana. Entre las bacterias más comúnmente aisladas en estos pacientes infectados con virus de la influenza se pueden mencionar a *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma pneumoniae*. Sin embargo, la bacteria que con más prevalencia se halla en estos pacientes es, sin duda, *S. pneumoniae*, lo que indica claramente que existe un mecanismo de sinergismo entre los dos patógenos, que ha sido estudiada por varios laboratorios en los últimos años desde diferentes perspectivas (Smith and McCullers 2014; Paget and Trottein 2019; Aegerter et al. 2020; Shirey et al. 2019; Morris, Cleary, and Clarke 2017). Sin embargo, varias cuestiones acerca de este sinergismo todavía continúan sin dilucidarse.

Patogénesis de la coinfección

Los mecanismos subyacentes al sinergismo que existe entre *S. pneumoniae* e IAV son complejos y multifactoriales (McCullers 2006). En los últimos años se han realizado estudios que aportan nuevos conocimientos acerca de la interacción entre ambos patógenos. Sin embargo, la utilización de diferentes modelos animales, cepas de virus o bacteria utilizadas, o tiempo de exposición entre la infección viral y la bacteriana, explicarían los efectos opuestos de algunos modelos (McCullers 2014; Short et al. 2012). Un rasgo típico de esta interacción es que generalmente la máxima susceptibilidad a la superinfección bacteriana ocurre unos días después de que se establece la infección viral en un modelo experimental en ratones (McCullers and Bartmess 2003; Smith and McCullers 2014; Smith et al. 2013).

Cambios en el tracto respiratorio

Uno de los mecanismos propuestos para explicar el modo en que IAV predispone a una infección secundaria bacteriana es el daño directo que produce el virus sobre el epitelio pulmonar. Esta disrupción epitelial deja desprotegida la membrana basal que subyace al epitelio. El neumococo

posee diversos factores de virulencia, como PspA y PspC, que permiten la adhesión a componentes extra citoplasmáticos (King, Lei, and Harmsen 2009). Sin embargo, este efecto se observa cuando experimentalmente se utilizan virus altamente patogénicos. El uso de virus de baja patogenicidad no produce daño del epitelio y aun así se puede observar un aumento de la carga bacteriana (McCullers 2006).

El aumento de la disponibilidad de receptores libres que median la adherencia bacteriana es uno de los mecanismos que mejor explica las infecciones secundarias bacterianas. Como se explicó previamente, la NA viral produce la escisión del ácido siálico de los glicoconjugados, exponiendo receptores celulares a los cuales neumococo se puede unir. Por otro lado, la respuesta inmune contra IAV altera la expresión de diversas proteínas, favoreciendo la expresión de receptores como rPAF (McCullers et al. 2008; Smith and McCullers 2014).

Uno de los efectos netos de la infección viral es la obstrucción de las vías respiratorias. La inhibición de la liberación de agentes surfactantes, la estimulación de la secreción de mucina combinado con fibrina, en conjunto con el ácido siálico liberado, crean un medio que favorece el crecimiento bacteriano (McCullers 2006). Sumado a esto, la actividad ciliar se ve comprometida, lo que afecta a la eliminación bacteriana (Pittet et al. 2010).

Recientemente se ha descrito que IAV, así como otros virus respiratorios, son capaces de interactuar directamente con la superficie bacteriana. Esta unión favorece la adherencia bacteriana a las células epiteliales pulmonares (Rowe et al. 2019).

Cambios en la Respuesta Inmune

La alteración de la respuesta inmune es crítica para la instauración de una infección secundaria bacteriana. El reconocimiento de ARN viral por parte de sensores de la inmunidad innata (como son los receptores TLR3, TLR7, RIG1 y el complejo inflamósoma) en las células epiteliales, dispara la producción de una masiva cantidad de interferones tipo I y III (IFN-I, IFN-III), en conjunto con varias citoquinas y quimiocinas. La acción paracrina de estos mediadores promueve el infiltrado de células como macrófagos y neutrófilos, cuya participación posibilita la eliminación del virus a costa de un daño tisular. Luego de que se produce el estallido inflamatorio, la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y la expansión de células T reguladoras terminan resolviendo la inflamación. Esta etapa antiinflamatoria favorece a que se produzca una superinfección bacteriana. En este punto los interferones, en especial los IFN-I, juegan un papel clave (Paget and Trottein 2019).

La acción de IFN-I inhibe el reclutamiento de neutrófilos. Esto ocurre mediante la inhibición de quimiocinas tales como CXCL1 y CXCL2, así como también la reducción de la secreción de la citoquina

IL-17 por parte de las células T no convencionales. El reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, dependiente de una respuesta inmune T_H17 es esencial para el control y la eliminación de neumococo (Paget and Trottein 2019; Shirey et al. 2019). En un estudio realizado en una población humana, el proceso de desgranulación de los neutrófilos ya existentes en la nasofaringe humana se ve afectado cuando se enfrenta a los individuos a virus atenuados. Además, en estos mismos individuos se observó una disminución del reclutamiento de monocitos seguido a la infección con neumococo (Jochems et al. 2018). Por otro lado, se ha postulado que el IFN- γ (también participante de la respuesta antiviral) disminuye la capacidad de fagocitosis al reducir la expresión en macrófagos del receptor depurador MARCO. Esto contribuiría con una disminución de la eliminación bacteriana (Shirey et al. 2019).

Efectos bacterianos en la eliminación de IAV

Hasta el momento sólo se ha discutido cómo la infección con IAV afecta la respuesta del hospedador y la invasión bacteriana. Sin embargo, como se trata de un mecanismo sinérgico, es lógico pensar que estas infecciones bacterianas secundarias pueden producir efectos beneficiosos para el virus. Experimentalmente, se observan de modo constante, cargas virales aumentadas y disminución de la eliminación de IAV, en modelos de coinfección en animales (McCullers and Bartmess 2003; Smith et al. 2013; Smith and McCullers 2014; Iverson et al. 2011; McCullers and Rehg 2002; Weeks-Gorospe et al. 2012). La explicación de cómo la infección bacteriana afecta al virus continúa sin ser del todo dilucidada. Dichos efectos podrían deberse a una interacción virus-bacteria o a la modulación de la respuesta inmune anti-viral (Smith and McCullers 2014). Estudios cinéticos sugieren que *S. pneumoniae* acelera la liberación de IAV a partir de células epiteliales (Smith et al. 2013).

Objetivos

OBJETIVOS

En este trabajo nos planteamos estudiar el mecanismo por el cual *S. pneumoniae* es capaz de adaptarse a situaciones de estrés que le permiten sobrevivir a nivel intracelular en células del hospedador. Se pretende abordar diferentes aspectos de la interacción hospedador-patógeno, que aporten conocimientos acerca de los mecanismos moleculares subyacentes a la infección de células epiteliales por parte de neumococo. Por otra parte, es de nuestro interés investigar la contribución de los TCS bacterianos en el estadio intracelular, el rol de la acidificación en la supervivencia intracelular de la bacteria, así como también aquellos mecanismos moleculares que facilitan el sinergismo con influenza A, incrementando la susceptibilidad a infecciones neumocócicas en células infectadas previamente con el virus.

Objetivos Específicos

Nuestros objetivos están orientados a determinar la relevancia de diferentes factores tanto bacterianos, virales y eucariotas en los mecanismos de supervivencia intracelular del neumococo. Este trabajo se encuentra organizado en dos partes con el fin de lograr los siguientes objetivos:

1. Determinar cuál es el rol que cumple la vía de señalización compuesta por StkP y ComE, en la supervivencia intracelular de neumococo en células epiteliales de pulmón.
2. Estudiar si la infección previa con IAV resulta en una alteración de la supervivencia intracelular de neumococo.
 - A. Analizar si algún TCS de neumococo estaría involucrado en la adaptación bacteriana a los cambios celulares promovidos por la infección previa con IAV.
 - B. Determinar si los cambios causados por el virus en la vía autofágica repercuten en el estadio intracelular de la bacteria.

Resultados Parte 1

PARTE 1: contribución de la vía StkP/ComE en la vida intracelular de neumococo

Resultados

Como se mencionó en la introducción, el TCS12 compuesto por ComD/ComE es esencial para el mecanismo de “*quorum sensing*” que permite la inducción de un estado de competencia, a pH ligeramente alcalinos. Alternativamente, existe un proceso de autólisis bacteriana que se dispara a pH ácido, denominado ASIL (*Acidic Stress Induced Lysis*). Estudios previos de nuestro laboratorio determinaron que el regulador de respuesta ComE es indispensable para que se produzca tal fenotipo, aunque ComD no ejerce ningún rol (Pinas et al. 2008). Además, se descartó que otra HK sea la encargada de fosforilar a ComE, en un mecanismo de conversación cruzada (o *crossstalk*) entre TCS (Pinas et al. 2018). Adicionalmente, la fosforilación de ComE en el residuo aspartato 58, sitio donde ComD la fosforila, no es necesaria para el mecanismo de ASIL (Pinas et al. 2018). Esto condujo al laboratorio a pensar si otra quinasa es la que participa en este mecanismo. Más precisamente, se indagó si la proteína StkP es la responsable de este fenotipo debido a su demostrada participación en la expresión del operón *comCDE* durante el desarrollo de competencia a pH 7,8 (Pinas et al. 2008). Efectivamente, la proteína StkP es el otro componente de este *crossstalk*. Esta serín treonín quinasa fosforila a ComE en el residuo treonina en la posición 128 de su dominio receptor. La fosforilación de ComE por parte de StkP, inducida a pH ácido, genera un cambio conformacional que aumenta su afinidad por *pcomC* (el promotor del operón *comCDE*, autoregulado por ComE) (Pinas et al. 2018). Por último, las mutantes Δ *stkP*, *stkP*^{K42R} (codifica una StkP con capacidad de fosforilar disminuida), *comE*^{T128A} (codifica la proteína ComE^{T128A}, incapaz de ser fosforilada por StkP) y Δ *comE* presentan un fenotipo ASIL bloqueado, indicando que esta vía es la responsable de la regulación de este proceso (Pinas et al. 2018).

La vía StkP/ComE induce cambios globales en el transcriptoma

En esta tesis se plantearon objetivos claves para profundizar en el conocimiento de este nuevo mecanismo de señalización descrito en nuestro laboratorio. Una de las primeras cuestiones que se abordó fue conocer de qué manera incidía esta nueva vía de señalización en la fisiología de neumococo, principalmente en condiciones de estrés ácido. Para determinar los genes regulados por este sistema de *crossstalk* en neumococo, se procedió a realizar un análisis de expresión diferencial

del transcriptoma. Dicho análisis fue realizado mediante RNAseq en colaboración con la empresa Xcelris Genomics. Para tal fin, tanto la cepa salvaje (*wt*) como la mutante *comE^{ET128A}* (codifica la proteína ComE^{ET128A}, incapaz de ser fosforilada por StkP) fueron cultivadas a pH 5,9 por 1 h.

En total, se hallaron 104 genes diferencialmente expresados en la mutante *comE^{ET128}* comparado con la cepa *wt*, de los cuales 51 eran genes que se encontraban regulados negativamente, mientras que los 53 genes restantes presentaron una expresión incrementada. En base a este análisis, se pudo determinar que la vía de señalización compuesta por StkP/ComE afectaba, directa o indirectamente, la expresión de genes involucrados en una gran diversidad de procesos fisiológicos de la bacteria como son la respuesta al estrés oxidativo, el metabolismo de purina/pirimidina, de aminoácidos y el metabolismo central, la biosíntesis de la pared celular, el transporte de metabolitos, y genes que forman parte de estructuras ribosomales, entre otros (Figura 6). La lista de genes obtenida indicó que esta nueva vía de señalización induce cambios globales en el transcriptoma neumocócico, como respuesta fisiológica al estrés ácido (Tabla S3).

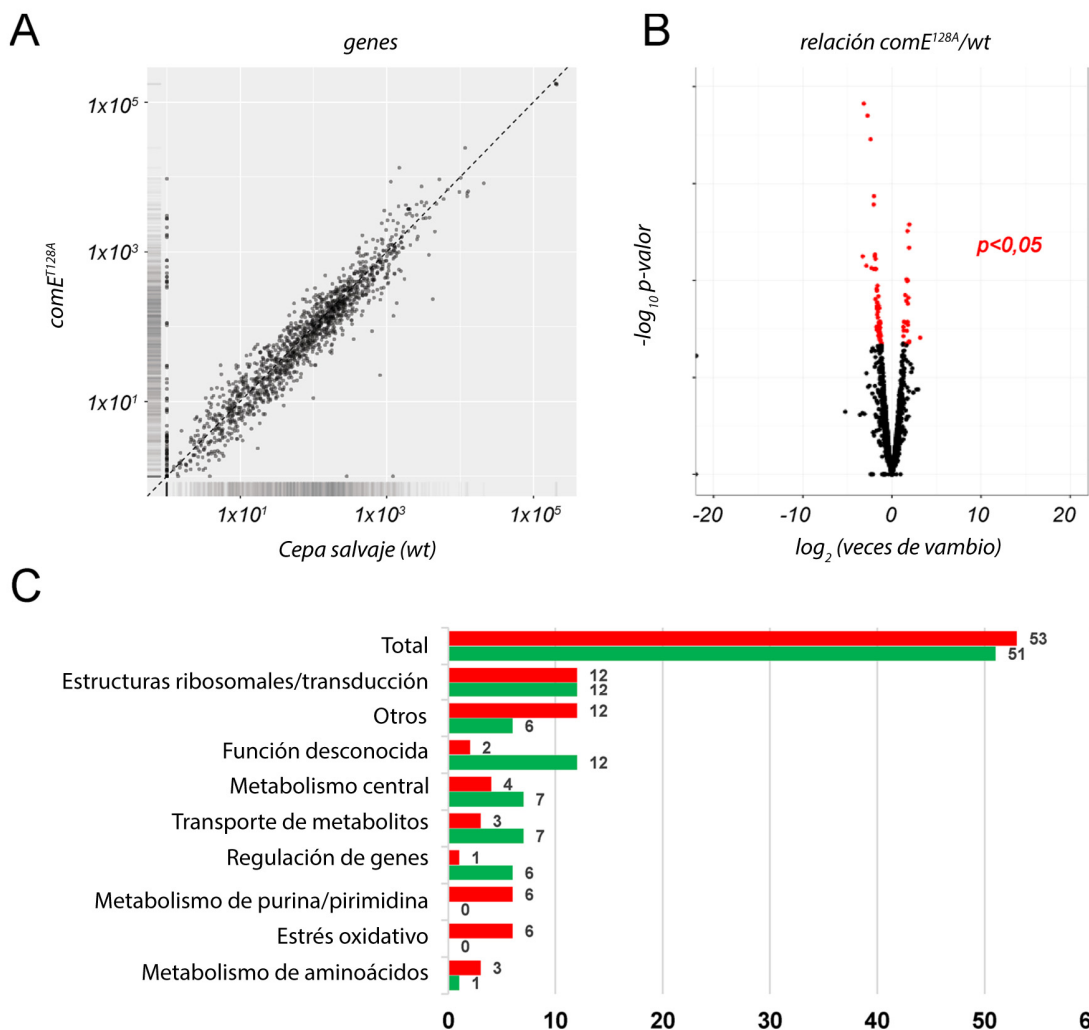


Figura 6. La vía *StkP/ComE* induce cambios globales del transcriptoma a pH ácido. A) Gráfico de dispersión (o Scatter plot) que muestra la dispersión de los datos que surgen del análisis de expresión génica del RNA-seq. En el eje x se representan los valores de expresión génica para la condición de control (*wt*) y en el eje y aquellos para la condición a estudiar (*comE^{Δ128A}*). **B)** Gráfico del volcán (Volcano plot) de los datos del análisis de expresión diferencial. En el eje de las y están representados los valores del $-\log_{10}$ del p-valor de cada gen, y en el eje de las x, se muestra el \log_2 de las veces de cambio en la expresión de un determinado gen en *comE^{Δ128A}* con respecto a *wt*. **C)** Categorías de genes regulados por ComE obtenidos a partir del análisis de RNAseq.

Validación de resultados de RNA-seq

Luego de clasificar los genes en distintos grupos, se procedió a la validación de algunos datos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcriptasa Reversa (qRT-PCR). Para decidir qué grupo de genes iban a ser sometidos a una segunda medición, se tuvo en cuenta a aquellos que podrían tener algún rol en la sobrevivencia intracelular en neumocitos, particularmente aquellos relacionados a respuesta al estrés. Un grupo de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo presentaron un perfil de expresión disminuido en la mutante *comE^{Δ128A}*, tales como *spxB*, *sodA* y *tpxD*, los cuales codifican, respectivamente, una piruvato-oxidasa que produce H_2O_2 a partir de O_2 (SpxB), una superóxido-dismutasa que produce H_2O_2 a partir del anión superóxido (SodA), y una tiol-peroxidasa que cataliza la oxidación del H_2O_2 y que contribuye a la respuesta al estrés oxidativo (TpxD). Se encontró que los niveles de transcriptos de *spxB*, *sodA* y *tpxD* estaban regulados negativamente (18, 2.8 y 2.7 veces respectivamente) en la mutante *comE^{Δ128A}* (Figura 7). También se validó la expresión del gen *fatD*, a partir del cual se expresa una proteína transportadora de hierro. Se pudo determinar que este gen está sobreexpresado en la mutante casi 19 veces con respecto a la cepa *wt*. Además, se validaron los niveles de expresión del gen *murN* involucrado en la síntesis de peptidoglicano. Aunque el análisis de RNA-seq mostró que dicho gen estaba sobre expresado en la mutante *comE^{Δ128A}*, mediante qRT-PCR se observó que su expresión era 4 veces menor que en la cepa *wt* en tres ensayos independientes, sugiriendo que podría tratarse de un falso positivo (Figura 7).

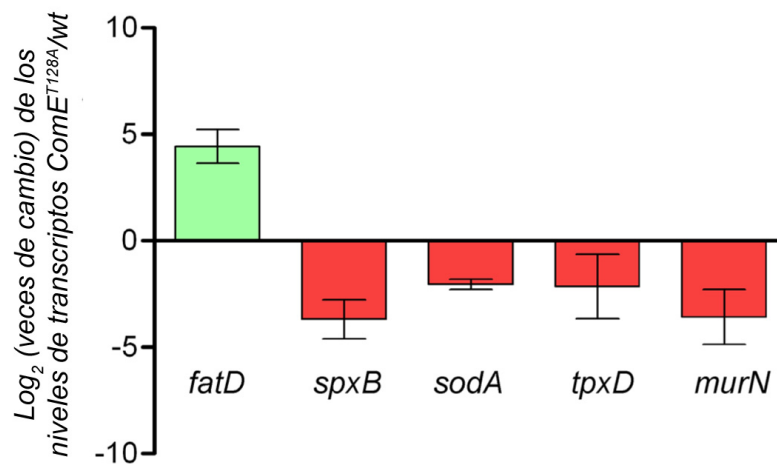


Figura 7. Validación de datos de RNA-seq mediante ensayos de qRT-PCR. Cada una de las cepas fue sometida a las mismas condiciones experimentales que se realizaron para el análisis de RNA-seq. En el gráfico están representados los valores del log₂ de las veces de cambio de cada transcripto *en* comE^{T128A} con respecto a la cepa wt. La expresión relativa de cada gen fue calculada usando el método de Livak y Schmittgen ($\Delta\Delta Ct$). El gen *gyrA* se utilizó para normalizar los ensayos. Las barras de error corresponden al Error Estándar de la Media (SEM). Las diferencias de expresión de los genes graficados fueron estadísticamente significativas, mediante *Student's t-test* ($p < 0,05$).

La vía StkP / ComE controla la producción de H₂O₂ y la respuesta al estrés oxidativo

Mediante RNA-seq y qRT-PCR, se determinó que los genes involucrados en la producción de H₂O₂ y en la respuesta al estrés oxidativo se encuentran bajo el control de la vía StkP/ComE. Para corroborar estas observaciones, se realizaron ensayos funcionales orientados a indagar el rol que cumple este nuevo sistema de señalización en el estado redox de la bacteria. Se hicieron mediciones de la producción de H₂O₂ de cada cepa cultivada en medios ácidos, como así también se determinó la susceptibilidad de cada una de ellas frente a H₂O₂ exógeno.

Las mutantes *comE^{T128A}*, Δ *comE* y Δ *stkP* mostraron una disminución de 4 veces en su producción de H₂O₂ en comparación con las cepas wt y la revertante *comE^{A128T}*, que probablemente sea causada por la expresión reducida de SpxB y Soda (Figura 8A). Además, se observó una reducción de 10 veces en la susceptibilidad al H₂O₂ de las mutantes *comE^{T128A}*, Δ *comE* y Δ *stkP* en comparación con la cepa wt. Esto podría deberse a la expresión reducida de la peroxidasa TpxD. Estos resultados apoyan la

noción de que la vía StkP/ComE es esencial para el control de la producción H_2O_2 y para la tolerancia al mismo (Figura 8B).

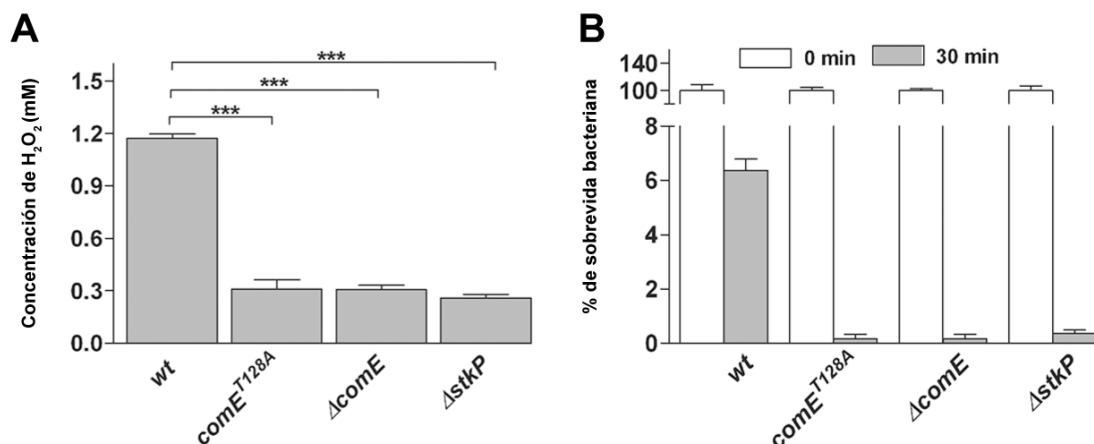


Figura 8. La vía StkP/ComE controla el estrés oxidativo en condiciones ácidas. A) La producción de H_2O_2 se encuentra alterada en las mutantes $\Delta comE$ y $\Delta stkP$. Las células se cultivaron en BHI (infusión cerebro-corazón) a 37°C a una DO_{620nm} de 0,3, luego se diluyeron en medio Todd-Hewitt (pH 5,9) y se incubaron a 37°C a una DO_{620nm} de 0,3. La concentración de H_2O_2 se determinó mediante la prueba de peroxidasa, como se describe en Materiales y Métodos. Las concentraciones de H_2O_2 producidas (mM) se normalizaron respecto del número de células viables. **B)** Las mutantes $\Delta comE$ y $\Delta stkP$ presentaron mayor susceptibilidad al H_2O_2 . Las bacterias se cultivaron en medio BHI hasta DO_{620nm} 0,3, y luego fueron expuestas al peróxido en una concentración de 20mM. Se realizaron recuentos de UFC en distintos tiempos. El tiempo 0 corresponde al momento en que se exponen las bacterias al peróxido. La resistencia al H_2O_2 , a 30 min post-exposición, se expresa como el porcentaje de sobrevivencia bacteriana. Ambos gráficos corresponden a un experimento representativo de al menos 3 ensayos independientes. Los valores representan la media \pm desviación estándar (DE). El test estadístico utilizado fue Anova de una vía, seguido por Test Post Hoc Tukey ($p < 0,001$ ***).

La vía StkP/ComE regula la expresión de murN y modula la susceptibilidad a la lisis inducida por antibióticos

Como ya se mencionó anteriormente, aunque el análisis de RNAseq mostró que el gen *murN* estaba sobre-expresado en la mutante *comE*^{T128A}, su expresión medida por qRT-PCR fue en realidad 4 veces menor que la cepa wt. El gen *murN* codifica para la enzima MurN, que participa en etapas tempranas de la síntesis de peptidoglicano (PG). El PG del neumococo está compuesto por cadenas de glucanos de N-acetil glucosamina y N-acetil murámico, a los cuales se le unen pentapéptidos. MurN y MurM son las enzimas encargadas de añadir “ramificaciones” de L-ser-L-ala o L-ala-L-ala a los pentapéptidos presentes en el ácido N-acetil murámico. La mayoría de las cepas poseen un bajo

porcentaje de estos péptidos ramificados en su pared celular, pero éstos son abundantes en cepas resistentes a β -láctamicos. Se ha descrito que la mutante del operón *murMN* tiene alteraciones de la pared celular y presenta una mayor susceptibilidad a la lisis inducida por antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular (Filipe, Severina, and Tomasz 2002; Filipe and Tomasz 2000). Para determinar si la expresión alterada de *murN* en la mutante *comE^{T128A}* podría modificar la susceptibilidad a los antibióticos, se determinó la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) de antibióticos que afectan a la pared celular, tales como fosfomicina, vancomicina, penicilina, cefotaxima, cefazolina y piperacilina en las cepas *comE^{T128A}* y *wt*. La CIM de fosfomicina en la mutante *comE^{T128A}* (170 $\mu\text{g} / \text{ml}$) fue mayor que la cepa *wt* (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$), mientras que las CIMs para vancomicina, penicilina, cefotaxima, cefazolina y piperacilina fueron similares entre estas cepas. El efecto lítico típico de fosfomicina (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 1xCIM) y vancomicina (0,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 1xCIM) sobre la cepa *wt* se inhibió en la cepa *comE^{T128A}* (Figura 9). La susceptibilidad disminuida a estos antibióticos en la cepa *comE^{T128A}* sugiere alteraciones de la pared celular consistentes con la represión de ASIL mostrada por esta mutante (Pinas et al. 2018).

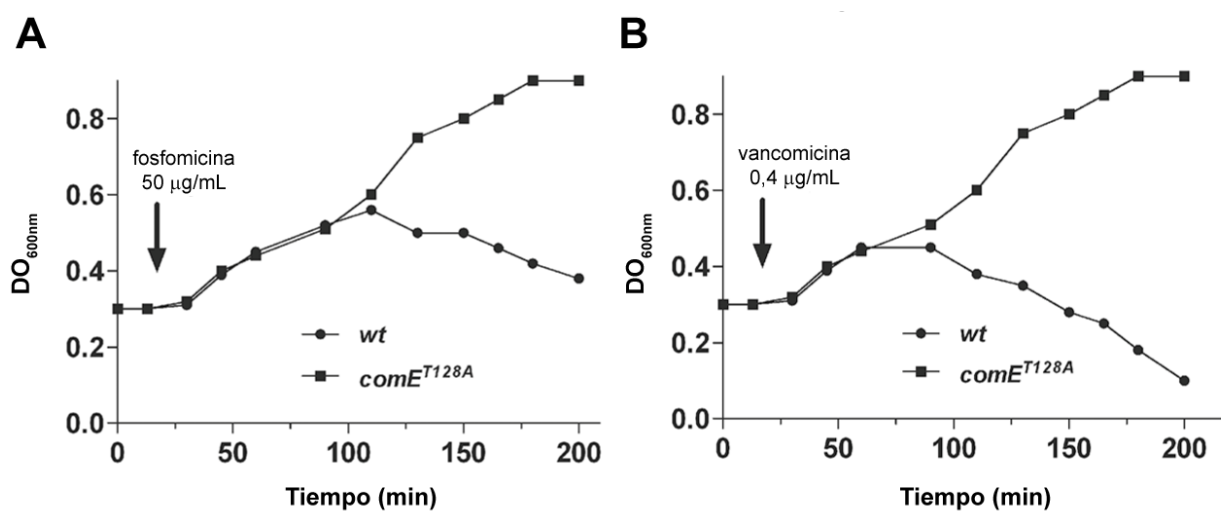


Figura 9. StkP/ComE modula la susceptibilidad a la lisis inducida por antibióticos. La mutante *comE^{T128A}* fue más resistente a la lisis inducida por antibióticos inhibidores de la pared celular que la cepa *wt*. Las células se cultivaron en BHI (pH 7,2 a 37°C) a una DO_{600nm} de 0,3, y se añadieron fosfomicina **A**) y vancomicina **B**) en cultivos independientes a concentraciones finales de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. La lisis celular de cultivos bacterianos se determinó por turbidimetría a DO_{600nm} durante más de 3 h.

La sobrevida intracelular de S. pneumoniae en neumocitos es controlada por StkP/ComE

Anteriormente, nuestro laboratorio describió que ComE está involucrado en la respuesta al estrés ácido y en el mecanismo de supervivencia intracelular neumocócica en los neumocitos (Cortes et al. 2015). Adicionalmente, se sabe que StkP fosforila ComE. Para determinar si esta nueva vía afecta la supervivencia neumocócica, se evaluaron las capacidades de supervivencia intracelular en células epiteliales respiratorias, de las cepas $\Delta stkP$, $stkP^{K42R}$ (actividad de quinasa reducida), $\Delta comE$, $comE^{T128A}$ (codifica la proteína ComE^{T128A}, incapaz de ser fosforilada por StkP) y $comE^{A128T}$ (revertante) en comparación con la cepa *wt*. Para ello, se estableció un modelo de cultivo celular en el cual se utilizó la línea celular A549 (proveniente de carcinoma de pulmón humano). Mediante este ensayo se pudo observar que las cepas $\Delta stkP$, $stkP^{K42R}$, $\Delta comE$ y $comE^{T128A}$ presentan una mayor supervivencia en comparación con $comE^{A128T}$ o *wt* (Figura 10A), lo que indica que la vía StkP/ComE controla la supervivencia neumocócica en los neumocitos. Con el objeto de discriminar si este fenotipo podría resultar del aumento de ATR o disminución de ASIL, se probó la mutante $\Delta lytA$, la cual carece de la producción de la autolisina mayor de neumococo y por lo tanto presenta un fenotipo de ASIL bloqueado. La supervivencia intracelular de $\Delta lytA$ fue similar a la cepa *wt* (Figura 10A). Esto sugiere que un ASIL bloqueado no es suficiente para aumentar la supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* en los neumocitos. En consecuencia, la mayor supervivencia intracelular mostrada por las mutantes $\Delta stkP$, $\Delta comE$ o $comE^{T128A}$ (Figura 10A) probablemente se deba a una mayor capacidad de ATR. Para probar esta hipótesis, se evaluó el fenotipo ATR de la mutante $comE^{T128A}$, pero en un contexto deficiente en *lytA* para descartar la autólisis residual. La cepa control (*wt*), cuando se pre-incubó a pH 5,9, aumentó el doble su porcentaje de sobrevida con respecto a cuando fue directamente expuesta a pH letal de 4,4 (Figura 10B). La mutante $comE^{T128A} \Delta lytA$ presentó un fenotipo de ATR significativamente aumentado con respecto a la cepa *wt*, ya que experimentó un aumento en su sobrevida de 15 veces cuando se pre-incubó a pH 5,9 (Figura 10B). Como control se utilizó la cepa $\Delta ciaR$, que además de tener un fenotipo de ATR disminuido, su sobrevida en células epiteliales es significativamente menor que la cepa *wt*. En conjunto, estos resultados respaldan la idea que el aumento de ATR explicaría el aumento de la tasa de supervivencia que muestra la mutante $comE^{T128A}$ en los neumocitos (Pinas et al. 2018).

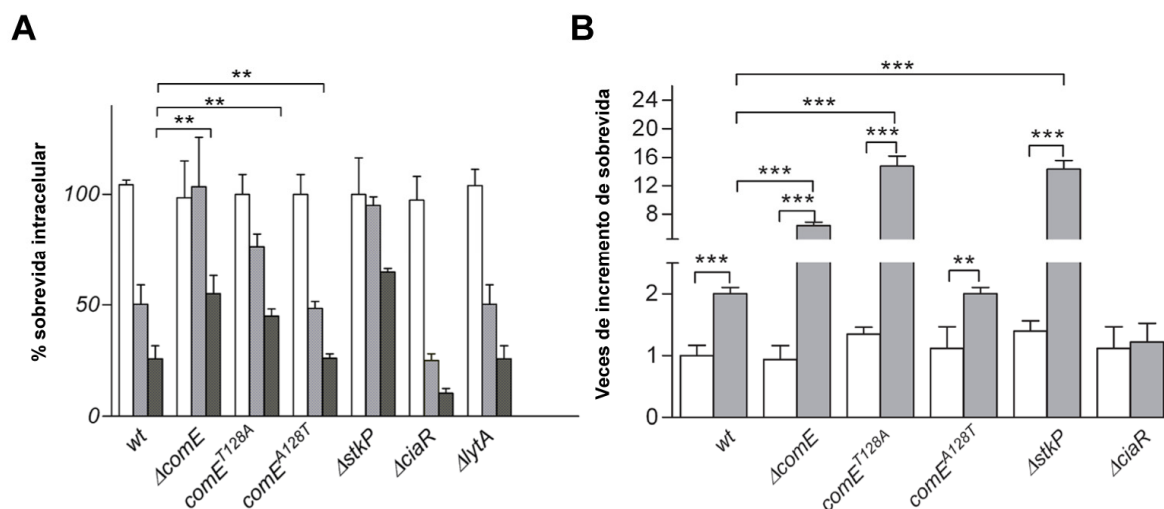


Figura 10. StkP/ComE controla la sobrevida intracelular de neumococo. A) Las mutantes $\Delta stkP$ y $\Delta comE$ mostraron una mayor sobrevida intracelular en comparación con wt en los neumocitos A549. Las células bacterianas se incubaron inicialmente durante 3 h en monocapas de neumocitos A549, y la progresión de la sobrevida se midió usando un ensayo de protección con antibiótico. Los porcentajes de sobrevida en cada tiempo se calcularon tomando como 100% el número de bacterias internalizadas después de 30 minutos de tratamiento antibiótico. A las 0 (barras blancas), 3 (barras grises) y 7 (barras negras) horas post-infección, los neumocitos se lisaron para liberar las bacterias intracelulares. Las muestras se diluyeron en BHI y se realizó recuento de UFC en placas de agar sangre. **B)** Las mutantes $\Delta stkP$ y $\Delta comE$ evidenciaron un fenotipo de ATR aumentado en comparación con wt. Para determinar el porcentaje de sobrevida, las bacterias no inducidas (barras blancas) se expusieron directamente durante 2 h a pH 4,4 (pH letal), mientras que las células inducidas (barras grises) fueron previamente incubadas durante 2 h a pH 5,9 (pH sub-letal) en medio THYE. Después de la exposición al pH letal, la supervivencia neumocócica se determinó mediante recuento de UFC en placas de agar. Para ambos paneles, los datos corresponden a un ensayo representativo de al menos tres experimentos independientes. Los valores corresponden a las medias \pm DE. El test estadístico utilizado fue *Anova de una vía*, seguido de *Test Post Hoc Tukey* (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Discusión Parte 1

ComE es el RR más estudiado en *S. pneumoniae* y pertenece a la subfamilia de factores de transcripción AlgR/AgrA/LytTR. Esta familia se caracteriza por presentar un dominio receptor típico de los RR bacterianos, pero a diferencia de la mayoría posee un dominio de unión al ADN (denominado dominio LytTR) que posee un motivo alado hélice-giro-hélice (wHTH, del inglés *winged helix-turn-helix*). Cuando es fosforilada por la histidín quinasa ComD en el residuo aspartato 58, ComE sufre cambios conformacionales que conducen a un aumento en su afinidad de unión al ADN, otorgándole la capacidad de regulación de la transcripción de genes de competencia al unirse a sus regiones promotoras (Claverys, Prudhomme, and Martin 2006; Martin et al. 2013; Ween, Gaustad, and Havarstein 1999). Recientemente, en nuestro laboratorio, se ha podido demostrar que *S. pneumoniae*, en ambientes ácidos, utiliza una vía alternativa de transducción de señales que involucra a ComE y StkP. Este mecanismo de señalización controla la respuesta al estrés ácido (ASIL y ATR), el estrés oxidativo, la biosíntesis de la pared celular y la supervivencia intracelular en los neumocitos.

Se ha demostrado que la activación de ComE, mediante la fosforilación de la treonina 128, es independiente de la activación mediada por el mecanismo de *quorum sensing* dependiente de la vía CSP/ComD (Pinas et al. 2018). Por lo tanto, se deduce que este RR requiere factores alternativos, como un sensor y/o una señal ambiental, para desencadenar una respuesta adaptativa al estrés. En particular, se propone que StkP sería capaz de detectar una señal ambiental alternativa como por ejemplo el pH ácido. Resultados previos del laboratorio son consistentes con esta hipótesis: el nivel de transcritos de *comE* inducidos en condiciones ácidas es el indicador de activación de ComE debido a que el operón *comCDE* está autorregulado (Pinas et al. 2018).

La producción neumocócica de H₂O₂ es una de las más significativas entre los agentes patógenos bacterianos. *S. pneumoniae* utiliza este metabolito intermedio para competir con la microbiota del tracto respiratorio y al mismo tiempo producir efectos citotóxicos en los tejidos del hospedador (Echlin et al. 2016; Regev-Yochay et al. 2007; Pericone et al. 2000). En este trabajo de investigación, el análisis del transcriptoma de la mutante *comE^{T128A}* reveló una marcada disminución en la expresión de los genes *spxB* y *sodA* cuando las bacterias son cultivadas en condiciones ácidas. Estos resultados se correlacionaron con una producción muy baja de H₂O₂ por parte de *comE^{T128A}*, lo cual puede asociarse con una baja expresión de SpxB y SodA. Teniendo en cuenta que el H₂O₂ es tóxico tanto para las células eucarióticas como bacterianas, se puede sugerir que la reducción de la producción de H₂O₂ en el mutante *comE^{T128A}* facilita su supervivencia intracelular en los neumocitos. Estos resultados concuerdan con una publicación reciente, cuyos resultados indican que la delección

del gen *spxB* incrementa la sobrevivencia intracelular de neumococo (Ogawa et al. 2018). En concordancia, *S. pneumoniae* genera mutantes hipervirulentas con *spxB* defectuoso durante la infección (Syk et al. 2014), lo que respalda la hipótesis de que los niveles de H₂O₂ se controlan durante la patogénesis neumocócica.

Debido a que *S. pneumoniae* carece de catalasa, y que la sobreproducción de H₂O₂ debe ser controlada para que sobreviva, este patógeno induce una resistencia al estrés oxidativo inducida por el H₂O₂ endógeno (Pericone et al. 2003). En este sentido, los análisis del transcriptoma de la mutante *comE^{T128A}* reveló una expresión disminuida de *tpxD*, que codifica para una tiol peroxidasa. Estos hallazgos se correlacionan con la mayor susceptibilidad a H₂O₂ por parte de la mutante *comE^{T128A}*. Del mismo modo, un estudio anterior mostró que la mutante *tpxD* (o *psaD*) era hipersensible a la exposición a altos niveles de H₂O₂ (Tseng et al. 2002). Anteriormente, un análisis de *microarrays* de la mutante *stkP* reveló que la expresión de *tpxD* está reprimida, lo que se correlaciona con una menor resistencia al H₂O₂ por parte de esta mutante, pero no se mencionó cuál era el supuesto mecanismo regulador (Saskova et al. 2007). En el presente estudio, se ha podido demostrar por primera vez que la vía StkP/ComE regula la respuesta al estrés oxidativo y la producción de H₂O₂ en condiciones ácidas. Probablemente estos procesos fisiológicos tengan un impacto directo en la supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* en los neumocitos.

En este trabajo se obtuvieron datos ambiguos en la mutante *comE^{T128A}*, respecto a la expresión en condiciones ácidas del gen *murN*, que codifica una de las primeras enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared celular de *S. pneumoniae* (Filipe, Pinho, and Tomasz 2000). Por un lado, el análisis de RNA-seq determinó que este gen está sobreexpresado en la mutante, mientras que por qRT-PCR se encontró lo contrario. En un reporte anterior (Filipe, Severina, and Tomasz 2002) se describió que la mutante del operón *murMN* mostró una mayor susceptibilidad a la lisis cuando dichas células fueron expuestas a antibióticos inhibidores de la pared celular como fosfomicina y vancomicina que interfieren en las etapas temprana y tardía de la biosíntesis de la pared celular, respectivamente. Se podría pensar que una expresión alterada de *murN* en la mutante *comE^{T128A}* puede causar un desequilibrio en la biosíntesis de peptidoglucano y modificar la susceptibilidad a los antibióticos inhibidores de la pared celular. En consecuencia, observamos que esta mutante tenía una CIM aumentada de fosfomicina en comparación con la cepa *wt*, así como una mayor tolerancia a la autólisis inducida por fosfomicina o vancomicina. Las supuestas alteraciones de la pared celular indicadas por las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos podrían explicar la inhibición de la autólisis mostrada por el mutante *comE^{T128A}* bajo estrés ácido, que probablemente interfirió con la activación de LytA.

StkP y ComE han sido involucrados anteriormente en la patogénesis neumocócica en diferentes estudios en los que utilizan modelos animales, y StkP parece ejercer un rol en la supervivencia bacteriana *in vivo* (Echenique et al. 2004; Oggioni et al. 2006). Por otra parte, la competencia mediada por ComE para la transformación del ADN también se ha asociado con la virulencia (Kowalko and Sebert 2008; Zhu and Lau 2011). En este sentido, la liberación de neumolisina (Ply) por autólisis mediada por competencia es considerada esencial en la patogénesis neumocócica (Guiral et al. 2005). Con respecto al impacto de la regulación de la vía StkP/ComE en patogénesis, se pueden postular dos escenarios diferentes. En nichos extracelulares, una subpoblación de neumococos expuestos al estrés ácido puede causar daño tisular por sobreproducción de H₂O₂ e inducción de ASIL para liberar Ply, promoviendo un suicidio mediado por la fosforilación de ComE vía StkP. Por otro lado, la fosforilación de treonina 128 en ComE podría reprimir la supervivencia neumocócica a nivel extracelular o intracelular en los tejidos del hospedador. En este trabajo, la atención estuvo centrada en la primera barrera que este patógeno debe cruzar para establecer una infección, como las células epiteliales pulmonares, planteándose la hipótesis de que la supervivencia intracelular en los neumocitos es importante para la patogénesis de *S. pneumoniae*. Las mutantes Δ stkP, Δ comE y comE^{T128A} se probaron en el modelo de infección neumocócica en los neumocitos A549, y revelaron una mayor supervivencia en comparación con la cepa *wt*. Por lo tanto, concluimos que esta supervivencia podría haber sido causada por el aumento de su capacidad de ATR, la disminución en la producción de H₂O₂ y la alteración de la biosíntesis de la pared celular que inhibe la autólisis inducida por estrés ácido (ASIL) (Figura 11).

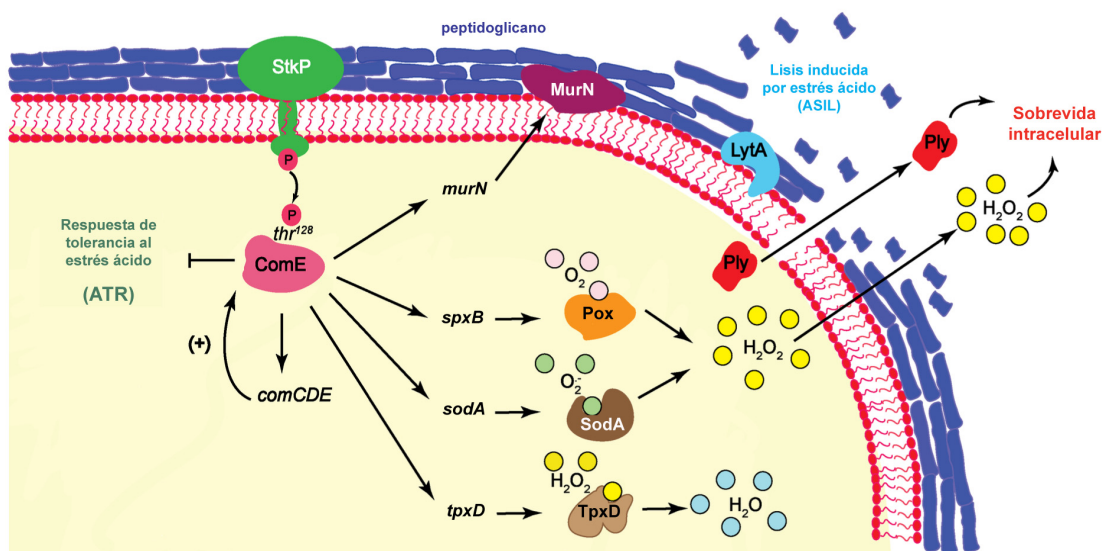


Figura 11. Modelo propuesto de cómo el *crosstalk* entre StkP y ComE afecta la respuesta al estrés ácido y los mecanismos de supervivencia intracelular cuando *S. pneumoniae* se

expone a condiciones ácidas. La fosforilación de ComE a pH ácido, por parte de StkP, en la treonina 128 genera cambios estructurales que le permiten la regulación de un gran número de genes, incluyendo la autoinducción del operón *comCDE*. Dentro de los efectos pleiotrópicos que esta vía regula, se puede resaltar el bloqueo de la respuesta de tolerancia al ácido (ATR) y la lisis inducida por estrés ácido (ASIL). Si bien el mecanismo preciso de ASIL no está del todo claro, se plantea que un desbalance de las enzimas encargadas de la síntesis de peptidoglicano (PG) conduce a una mayor fragilidad de la pared. Por otro lado, se induce una mayor producción de H₂O₂ al inducir la expresión del *spxB* que expresa una Piruvato Oxidasa. Asimismo, se induce la expresión de genes, como *sodA* y *tpxD*, encargados en la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (ROS). La liberación de neumolisina (Ply) mediante ASIL y la secreción aumentada de H₂O₂ conduciría a un mayor daño tisular, y por ende, a una respuesta inflamatoria exacerbada. Sin embargo, en un contexto donde la bacteria se halla dentro de células, tanto la liberación de Ply como la mayor producción de H₂O₂ conduce a una menor sobrevivencia intracelular.

Resultados Parte 2

PARTE 2: Impacto de la infección previa con el virus de influenza A en la sobrevivencia intracelular del neumococo en neumocitos

La existencia de un sinergismo entre el virus de influenza A (IAV) y *S. pneumoniae* ha sido descrita por diferentes laboratorios (Jochems et al. 2018; McCullers 2006, 2014; Paget and Trottein 2019), aunque el mecanismo patogénico preciso de esta interacción todavía sigue sin estar claro. Hasta el momento se ha abordado este sinergismo desde diversos enfoques para tratar de explicarlo. Por ejemplo, se ha informado que el IAV produce daño en las células epiteliales pulmonares, disminuyendo de esta manera el aclaramiento mucociliar y favoreciendo la adherencia e infección bacteriana (Levandowski, Gerrity, and Garrard 1985). Otro factor importante es la eliminación del ácido siálico de las mucinas a causa de la acción de la neuraminidasa viral, aumentando de este modo, la adherencia neumocócica (McCullers 2006, 2014). Con respecto al efecto sobre la respuesta inmune innata, se ha reportado que los macrófagos y neutrófilos infectados por IAV muestran una fagocitosis de neumococos deteriorada. Además, existen otros estudios relacionados a factores virales y bacterianos que contribuyen al mecanismo sinérgico (Morris, Cleary, and Clarke 2017).

Si bien *S. pneumoniae* es considerado típicamente como un patógeno extracelular, el interés acerca de su estadio intracelular se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Neumococo puede establecerse en diversos nichos intracelulares con el objetivo de evadir la respuesta inmune y poder diseminarse dentro del hospedador (Subramanian, Henriques-Normark, and Normark 2019). Sin embargo, hasta la fecha, no hay ninguna evidencia experimental de si este estadio intracelular transiente contribuye al mecanismo sinérgico entre IAV y *S. pneumoniae*. La segunda parte de esta tesis se ha enfocado en tratar de dilucidar cómo la infección previa con IAV afecta la sobrevivencia intracelular de *S. pneumoniae*.

Resultados

Modelo de coinfección de IAV y S. pneumoniae en neumocitos

Para el modelo de coinfección se utilizó la línea celular A549 proveniente de un adenocarcinoma de pulmón humano. Estas células tienen la particularidad de parecerse a los neumocitos tipo II, por lo que son ampliamente utilizadas en modelos de infecciones respiratorias (Zhao et al. 2015; Eierhoff et al. 2010; Hament et al. 2004; Fiedler, Wernke-Dollries, and Stark 1995). La cepa de IAV empleada presenta características antigénicas de tipo H₁N₁ denominada A/PR8/1934 o simplemente PR8

(Gerber, Loosli, and Hambre 1955; Magill and Francis 1937). Para realizar estos ensayos de co-infección, al igual que los experimentos de la Parte 1, se utilizó la cepa no capsular de *S. pneumoniae* denominada R801 (Lefevre, Claverys, and Sicard 1979). El esquema experimental se encuentra resumido en el siguiente gráfico (Figura 12).

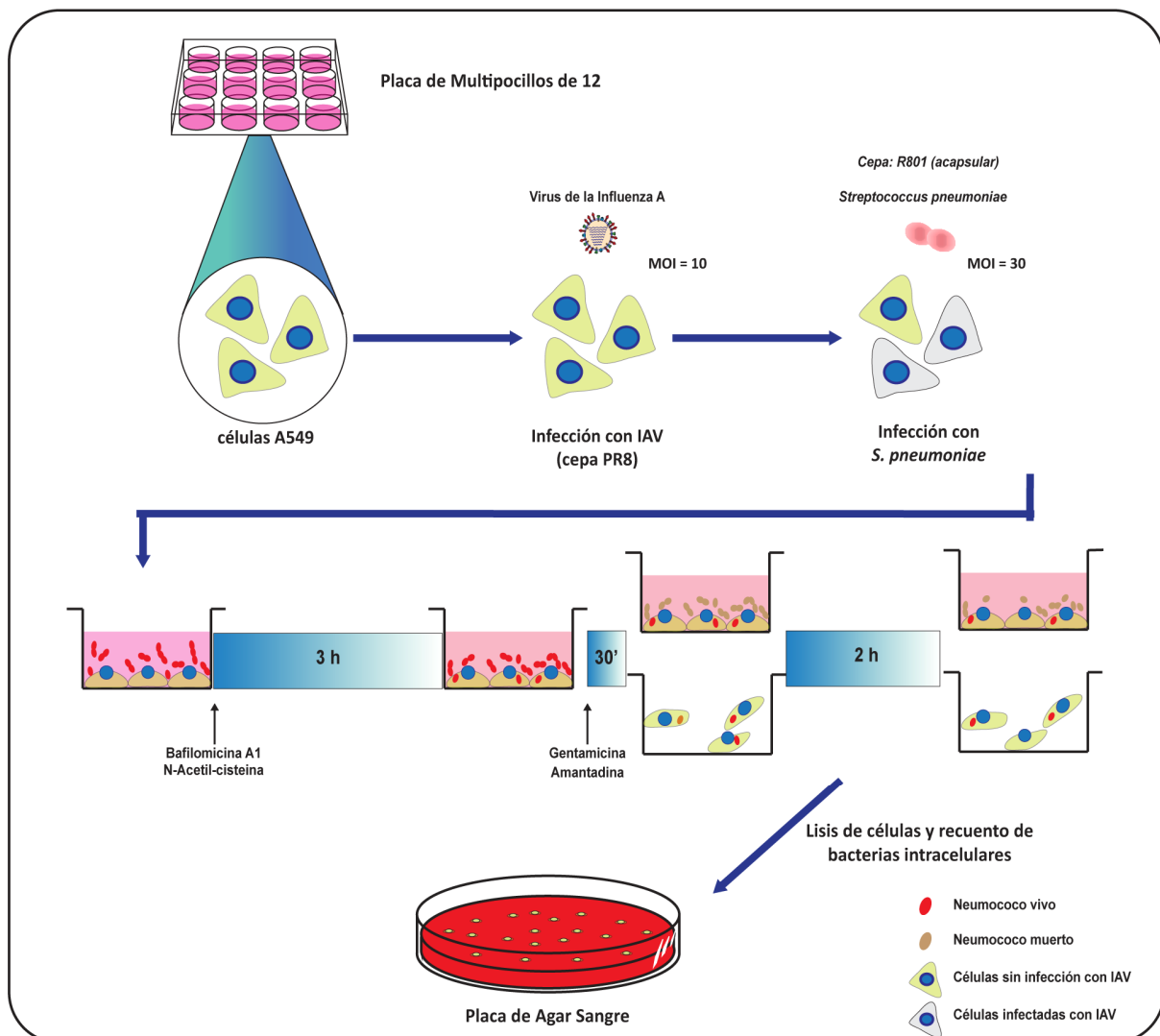


Figura 12. Modelo experimental de coinfección. Las células A549 son cultivadas hasta obtener una confluencia del 100%, luego son infectadas con el IAV con una multiplicidad de infección (MOI) variable (1-10) y especificada para cada ensayo. A las 24 h post-infección viral, se procede a la infección con R801 con una MOI de 30. Luego de 3 hs se trata con el antibiótico gentamicina, incapaz de ingresar dentro de la célula hospedadora, por 30 min. Inmediatamente, las células son lisadas para llevar a cabo el recuento de bacterias viables según se detalla en Materiales y Métodos. Este primer punto se considera como el tiempo 0h y su recuento como el 100% de la población intracelular de neumococo. En los demás tiempos, se repite el procedimiento y el recuento de UFC es referenciado al tiempo 0h. En el esquema se indica el momento en que se adicionan distintas drogas para diferentes variantes del modelo.

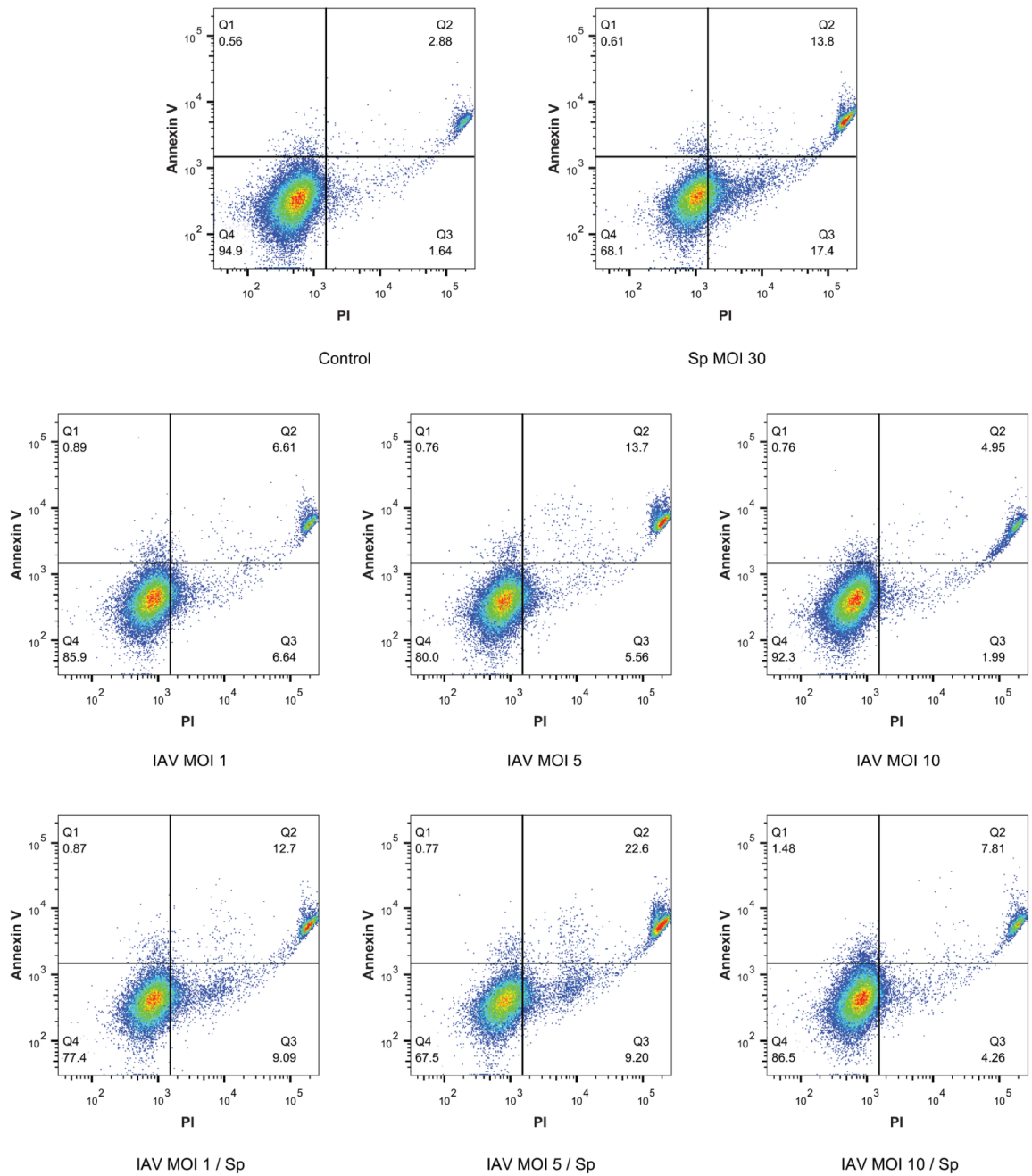
Algunas infecciones son capaces de ocasionar la muerte de la célula hospedadora, fenómeno que suele verse influenciado por la relación entre la cantidad de un determinado agente patógeno respecto del número de células eucariotas, es decir, la multiplicidad de infección (MOI del inglés: *multiplicity of infection*). En particular, tanto el neumococo como el IAV pueden inducir mecanismos que llevan a la muerte de la célula hospedadora, ya sea por apoptosis y/o necrosis (Bewley et al. 2011; Lee et al. 2013; Marriott and Dockrell 2006). Naturalmente, estos efectos están vinculados a factores de virulencia del patógeno y a mecanismos de defensa de la célula hospedadora. Sin embargo, un tiempo de infección o una cantidad de inóculo excesivos podrían producir artificialmente el mismo efecto. Por lo tanto, la cantidad de virus y bacteria usados, como así también el tiempo de infección en los ensayos de sobrevivencia, deben ser optimizados para poder observar una respuesta biológica sin comprometer la viabilidad de la célula infectada. La MOI bacteriana de 30 ya estaba estandarizada en nuestro laboratorio por estudios realizados previamente (Cortes et al. 2015; Pinas et al. 2018). Por esta razón, se procedió solamente a la selección de los niveles óptimos de MOI viral para el modelo de coinfección.

Con el objeto de escoger la MOI viral más apropiada para el modelo, se llevaron a cabo experimentos de coinfección en neumocitos tipo II. Las células A549 fueron infectadas con diferentes MOI virales de 1, 5 y 10, respetando siempre la MOI de 30 para neumococo. El porcentaje de apoptosis/necrosis de las distintas poblaciones celulares se determinó a través del marcaje de las células con Anexina-V e Ioduro de propidio, y posterior análisis mediante citometría de flujo. Anexina V se une a fosfatidilserina (PS) y es un marcador de apoptosis temprana, ya que PS transloca desde la cara interna de la membrana plasmática a la superficie celular poco después de iniciarse la cascada apoptótica. Por otro lado, el ioduro de propidio (IP) es un intercalante fluorescente del ADN que se utiliza como marcador de necrosis, pero es eficientemente excluida de células viables. Para llevar a cabo los estudios de infección con neumococo, resulta imperativo preservar la integridad de las células eucariotas, ya que funcionan como una barrera que protege de los antibióticos extracelulares a las bacterias intracelulares. Por lo tanto, se fijó como criterio que el porcentaje de apoptosis y necrosis de las células eucariotas sea menor al 20%.

Analizando las muestras que sólo fueron infectadas con IAV, el mayor porcentaje de células viables (alrededor del 92%) se encontró cuando la MOI utilizada era de 10, es decir la MOI más alta que se probó. En nuestro modelo de infección una MOI viral de 10 produce alrededor de un 3% más de células apoptóticas/necróticas con respecto a la muestra control (Figura 13A). Del mismo modo, en células coinfectadas, el mayor porcentaje de viabilidad se observó cuando las células se enfrentaron a una MOI viral de 10 y una MOI bacteriana de 30. En estas muestras, el total de células muertas era

de un 15%, lo que representa un 10% más que la muestra control. Teniendo en cuenta estos valores, se estableció que la relación óptima de virus:células es de 10 (Figura 13B).

A



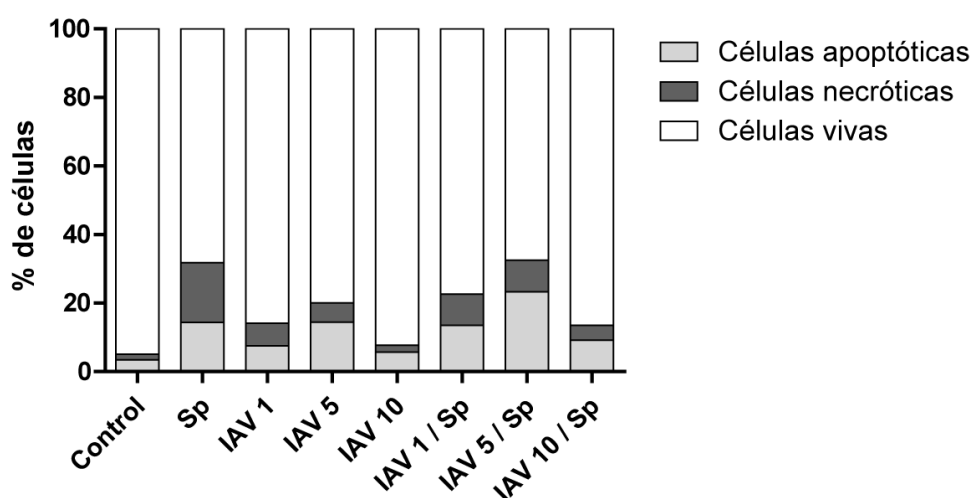
B

Figura 13. Evaluación de la viabilidad celular en el modelo de coinfección IAV-*S. pneumoniae*. **A)** Células A549 fueron coinfectadas con IAV (cepa PR8) y luego con neumococo (cepa R801). La evaluación de las poblaciones celulares se llevó a cabo luego de 24 horas post-infección viral en células solamente infectadas con IAV, y a las 3h post-infección con neumococo, en células co-infectadas. Para el análisis por citometría de flujo se utilizaron marcadores de apoptosis (Anexina V) y necrosis (IP). En cada cuadrante están representadas las distintas poblaciones celulares. El cuadrante Q1 corresponde a la población AnexinaV⁺-IP⁻ (cuadrante superior izquierdo), Q2 a la población Anexina V⁺-IP⁺ (cuadrante superior derecho), Q3 a la población Annexina V⁻IP⁺ (cuadrante inferior derecho) y Q4 a la población AnexinaV⁻ IP⁻ (cuadrante inferior izquierdo). Los porcentajes de células positivas se muestran en los cuadrantes correspondientes. Q1 corresponde a la población apoptótica, Q3 a la población necrótica, Q2 a apoptosis tardía o necrosis y Q4 a las células viables. **B)** Análisis cuantitativo de las distintas poblaciones en cada muestra. El 100% corresponde a 50.000 eventos. El gráfico de barras describe la distribución porcentual de células necróticas (gris oscuro), apoptóticas (gris claro) y viables (blanco) después de la infección con diferentes MOI de IAV o con coinfección con *S. pneumoniae*.

Una infección previa con IAV produce un aumento de la sobrevivencia intracelular de neumococo en neumocitos

La infección por IAV induce diversas alteraciones en las células infectadas, tanto en el metabolismo como en algunos procesos celulares, con el objetivo de generar un ambiente más propicio para su replicación y diseminación. En este contexto, pensamos que estos cambios en la fisiología de la célula pueden ejercer una influencia en el estadio intracelular de *S. pneumoniae*. Para evaluar si efectivamente existe un mecanismo de interacción entre ambos patógenos que modula la sobrevivencia bacteriana, se utilizó el modelo de coinfección descrito (Figura 12).

Las células A549 fueron infectadas con IAV por 24 hs, y posteriormente se enfrentaron con la cepa de neumococo R801. Luego de un período de 3h de incubación con las bacterias y posterior al tratamiento con gentamicina para eliminar bacterias extracelulares, se procedió al recuento de bacterias internalizadas en las células a diferentes tiempos. En este modelo se pudo apreciar que la infección viral previa produce un aumento significativo en la sobrevivencia intracelular de neumococo con respecto a células no pre-infectadas con el virus (Figura 14).

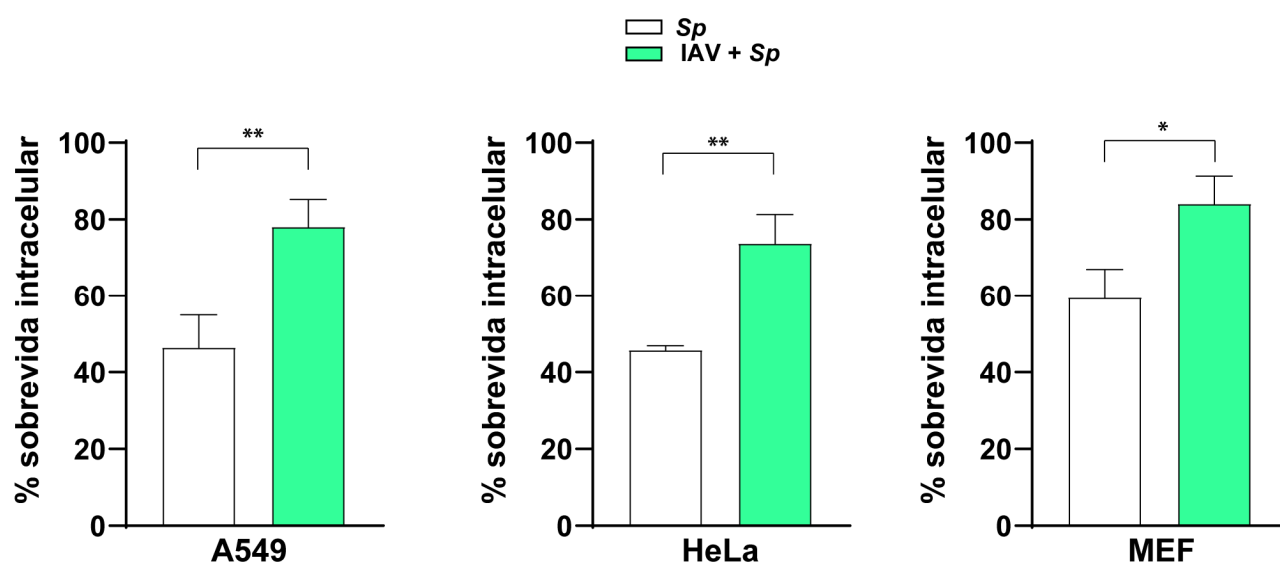


Figura 14. La preinfección con IAV induce un aumento en la supervivencia intracelular de neumococo.

En este gráfico se muestra el porcentaje de sobrevivencia de neumococo luego de la coinfección de neumocitos A549, como así también de células HeLa y MEF. Los datos graficados corresponden al % de sobrevivencia intracelular 2 horas posteriores respecto al tiempo 0h (el cual corresponde a 30 min post tratamiento con gentamicina). Las barras blancas corresponden a células sin infectar, y las barras verdes a células infectadas con IAV (MOI 10) 24 h previas al contacto con las bacterias. Cada gráfico es un experimento representativo de 3 experimentos independientes. En todos los experimentos, cada condición se realizó por triplicado. Los valores representan la media \pm DE. El test estadístico utilizado fue el t-test de Student. Las diferencias significativas se indican como (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Con el propósito de saber si el fenotipo producido era independiente del tipo celular, se llevaron a cabo ensayos de coinfección en otras líneas celulares, utilizando los mismos valores de MOI empleados para las células A549. Como se puede observar en la figura 14, el aumento del porcentaje de sobrevivencia bacteriana posterior a una primoinfección con IAV es reproducible en células HeLa (células provenientes de un adenocarcinoma de cuello de útero) y en células MEF (fibroblastos

embrionarios de ratón). Esto sugiere que existe un mecanismo sinérgico entre ambos patógenos independientemente de la línea celular utilizada.

Identificación de sistemas de transducción de señales bacterianos involucrados en el mecanismo sinérgico inducido por la coinfección entre IAV y el neumococo

En nuestro modelo de coinfección experimental se pudo determinar de manera clara que la infección previa con IAV resulta en un aumento de la supervivencia intracelular de neumococo. La pregunta que surge ante este fenotipo observado es: *¿Cuál o cuáles son los mecanismos moleculares que conducen a este sinergismo?* Sin lugar a dudas, IAV es capaz de alterar de manera drástica la fisiología celular. Las células infectadas con este virus muestran niveles alterados de distintas rutas metabólicas, así como también la disrupción de muchos procesos celulares, como el sistema de transporte de membranas y la autofagia, además de un desbalance en el equilibrio REDOX (Pyo et al. 2014). Teniendo en cuenta los cambios que el virus produce en la célula, se planteó la hipótesis de que neumococo debe ser capaz de percibir, probablemente mediante algunos de sus sistemas de transducción de señales, como los TCS, alguna alteración inducida por IAV en el ambiente celular que favorece su supervivencia intracelular.

Anteriormente en nuestro laboratorio, la Dra. Melina Cian desarrolló su tesis doctoral utilizando un modelo similar al presentado en esta tesis para realizar una búsqueda de mutantes carentes de histidín kinasas (HK) pertenecientes a los TCS de neumococo, con el fin de determinar si alguno de ellos está involucrado en el mecanismo sinérgico IAV-neumococo. En particular se interesó en aquellos TCS que no presentaran *per se* cambios en la sobrevida intracelular bacteriana en células sin estar previamente infectadas con IAV. Es decir, se descartó del análisis, mutantes como *hk09* y *ciaH*, que mostraban una mayor y menor capacidad de sobrevida con respecto a la cepa *wt*, respectivamente.

En dicho trabajo de tesis se encontró que la mutante *hk01::pJDC9*, en la cual el gen de la HK01 se encuentra interrumpido, logró sobrevivir en neumocitos del mismo modo que la cepa *wt*, sin embargo, no fue capaz de incrementar su sobrevida en células infectadas con IAV como sí lo hacía la cepa *wt*. Esto hace pensar que esta HK sería capaz de percibir algún cambio producido por el virus. Es importante señalar que esta cepa fue generada mediante un sistema de mutagénesis denominada inserción-duplicación, donde un plásmido no replicativo en neumococo (pJDC9) se inserta específicamente en el gen que se quiere estudiar. Esta estrategia presenta dos problemas. En primer

lugar, los fenotipos observados pueden deberse a mutaciones polares que suceden luego de la inserción de un fragmento de gran tamaño. En segundo lugar, existe la posibilidad de que estas mutantes reviertan espontáneamente debido a re-arreglos del ADN. Teniendo esto en consideración, en este trabajo se decidió validar este modelo utilizando mutantes obtenidas por mutagénesis utilizando el cassette de selección denominado Janus. Esta estrategia permite obtener deleciones de genes precisas mediante dos rondas de transformaciones (Sung et al. 2001).

Debido a los hallazgos mencionados previamente, el TCS01 (formado por *hk01* y *rr01*) fue renombrado por nuestro laboratorio como VisRH (del inglés Virus-induced stress). Se procedió entonces a la generación de las mutantes $\Delta visH$ y $\Delta visR$, que tienen delecionado al gen *hk01* y al gen *rr01*, respectivamente, mediante el uso del cassette Janus. El propósito de delecionar el gen *visR* fue determinar si la vía canónica de VisRH es la que está involucrada en el mecanismo sinérgico IAV-neumococo, o si en dicho fenotipo participa solamente la HK01 mediante un proceso de “*crosstalk*” con otro RR.

Se confirmó que los fenotipos de $\Delta visH$ y $\Delta visR$ eran similares a los mostrados por la mutante *hk01::pJDC9* (o *visH::pJDC9*), sin presentar cambios en su tasa de supervivencia en células A549 infectadas por IAV respecto a células no infectadas, a diferencia de la cepa *wt* (Figura 15). Además, se construyó la revertante de la mutante $\Delta visR$, llamada *wr visR+*. Esta cepa recuperó el fenotipo *wt* (Figura 15). Estos resultados confirmaron que *S. pneumoniae* necesita VisRH para ejecutar el mecanismo sinérgico que resulta en un aumento de la sobrevida intracelular en neumocitos A549 coinfectados con IAV.

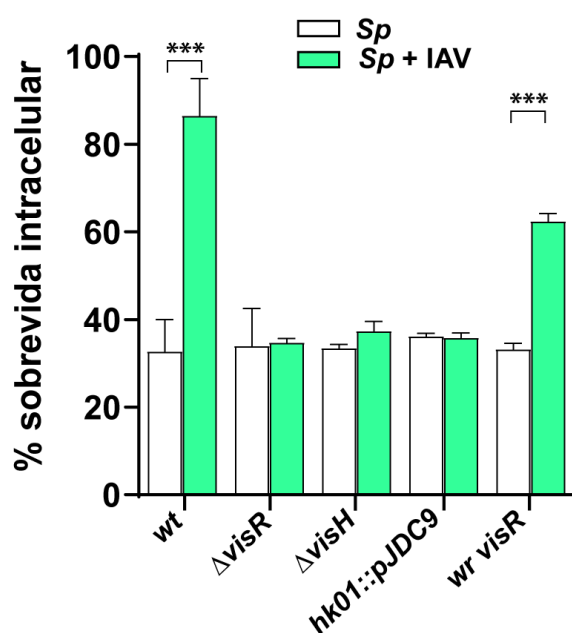


Figura 15. El TCS VisRH es necesario para el incremento en la supervivencia intracelular en neumocitos coinfectados con IAV. Las células A549 se infectaron previamente con un MOI viral de 10 durante 24 h, y luego coinfectadas con las cepas *wt*, Δ *visH*, *hk01::pJDC9* (o *visH::pJDC9*), Δ *visR* y la revertante de la mutante Δ *visR* (*wr visR+*). Los porcentajes de supervivencia se calcularon considerando la cantidad total de bacterias internalizadas después de 30 minutos de tratamiento con gentamicina (tiempo 0 h), como el 100% de supervivencia para cada cepa. Los valores graficados corresponden a los porcentajes de bacterias intracelulares viables a tiempo 2 h. Las células infectadas con IAV se indican con barras verdes y las células no infectadas con virus con barras blancas. Se grafica un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm DE. El test estadístico utilizado fue *Anova* de una vía, seguido del Test Post Hoc Tukey (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

VisRH participa en la respuesta de neumococo al estrés ácido

Como ya se ha mencionado, es bien sabido que los TCS bacterianos perciben las condiciones ambientales para generar una respuesta adaptativa a través del control de la regulación génica. De acuerdo a los resultados obtenidos en el punto anterior, es que surgió como hipótesis que VisRH detecta condiciones de estrés inducidas por IAV en los neumocitos, situación que *S. pneumoniae* debería superar para sobrevivir intracelularmente. Anteriormente, describimos que este patógeno necesita una respuesta de estrés ácido para la supervivencia intracelular en los neumocitos. Además, se ha informado que *S. pneumoniae* puede sobrevivir en vesículas ácidas, como por ejemplo en vesículas autofágicas de células epiteliales nasofaríngeas humanas Detroit 562 y en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) (Ogawa et al. 2018). Para determinar la posible contribución de VisRH en la respuesta al estrés ácido, primero se analizó la tolerancia al estrés ácido de la mutante Δ *visR* cuando las células bacterianas son expuestas a medios de cultivo a un pH letal de 4,8 durante 2 h. En esas condiciones se pudo observar una marcada disminución del porcentaje de supervivencia de la mutante Δ *visR*, aproximadamente 10^3 veces inferior con respecto a la cepa *wt*. A su vez, la cepa revertante *wr visR+* fue capaz de recuperar la tolerancia al estrés ácido que exhibe la cepa *wt* (Figura 16A). En un trabajo previo de nuestro laboratorio se reportó que la mutante *atpC^{A49T}*, que contiene una mutación puntual en la posición 49 de la subunidad ϵ de la F₀.F₁-ATPasa, una bomba de protones que controla el pH intracelular, es incapaz de inducir una respuesta frente al estrés ácido cuando *S. pneumoniae* se cultiva en medios acidificados (Cortes et al. 2015). Esta mutante se usó como control para la prueba de tolerancia ácida, y mostró un fenotipo similar al de la mutante Δ *visR*, una disminución de 10^4 veces en comparación con *wt* (Figura 16A). Esto sugiere una relación entre VisRH y la respuesta al estrés ácido de *S. pneumoniae*.

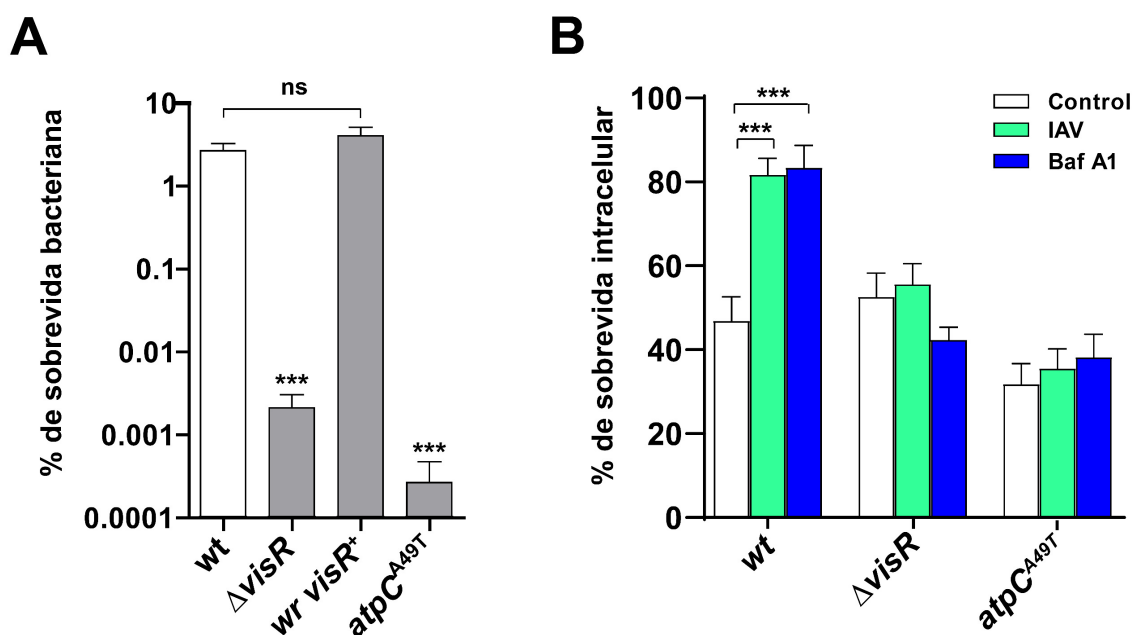


Figura 16. VisRH participa en la respuesta de neumococo al estrés ácido. **A)** La mutante $\Delta visR$ es susceptible al pH ácido. Las células $\Delta visR$, $wr visR^+$, $atpC^{A49T}$ y wt se cultivaron en BHI hasta un OD_{620nm} 0,3 y luego se incubaron en medio MD5 a pH 4,8 durante 2 h. Luego, las células viables se cuantificaron mediante el recuento de UFC en placas de agar BHI suplementado con sangre luego de 16h de incubación a 37°C. **B)** La neutralización lisosómica inducida por bafilomicina-A1 no afecta la supervivencia intracelular de la mutante $\Delta visR$. Las células A549 se infectaron con las células $\Delta visR$, $atpC^{A49T}$ y wt y se determinó la supervivencia intracelular como se describió anteriormente. Las barras blancas corresponden a células no infectadas por virus, las barras verdes a células infectadas con IAV y las barras azules a células tratadas con bafilomicina-A1. Ambos gráficos corresponden a ensayos representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm DE. El análisis estadístico utilizado fue Anova de una vía, seguido de Test Post Hoc Tukey ($p \leq 0,05$ *, $\leq 0,01$ **, $\leq 0,001$ ***).

En este contexto, y para evaluar el efecto de la acidificación de las vesículas en nuestro modelo de coinfección, se trataron las células A549 con Bafilomicina A1, un inhibidor de la V-ATPasa (Gagliardi, Rees, and Farina 1999) durante 3h, de manera simultánea con la infección neumocócica. La supervivencia neumocócica mostró un aumento significativo cuando la acidificación vesicular fue inhibida por el tratamiento con Bafilomicina A1 100 nM. Sin embargo, la supervivencia de la mutante $\Delta visR$ no evidenció modificaciones (Figura 16B), sugiriendo que estas bacterias no son capaces de responder a la variación de pH en vesículas. Para estos ensayos, también se utilizó la mutante $atpC^{A49T}$ que había demostrado una supervivencia intracelular disminuida en macrófagos RAW 267.4 debido a su menor capacidad de sobrevivir en medios acidificados (Cortes et al. 2015). Para analizar su impacto en el mecanismo sinérgico entre IAV y *S. pneumoniae*, se probó la mutante $atpC^{A49T}$ en el modelo de coinfección en células A549. En primer lugar, se pudo comprobar que esta mutante presentaba el mismo fenotipo de supervivencia en las células A549 que el encontrado en los

macrófagos RAW 267.4, mostrando una disminución significativa en comparación con la cepa *wt* (Figura 16B). Además, cuando las células A549 infectadas con IAV fueron desafiadas con esta cepa, no se observaron cambios significativos en su supervivencia intracelular en comparación con las células A549 no infectadas con virus. Cuando se infectaron los neumocitos A549 tratados con Bafilomicina A1 con las células *atpC^{A49T}*, no hubo ninguna variación significativa en el porcentaje de sobrevivencia, mostrando el mismo fenotipo que la mutante *ΔvisR* (Figura 16B). En conjunto, estos resultados sugieren que, para un sinergismo eficiente en las células infectadas con IAV, *S. pneumoniae* debe responder al estrés ácido al que se enfrenta, principalmente a nivel intravesicular, para sobrevivir en los neumocitos. Por este motivo, se propone que VisRH está involucrado en la regulación de la expresión de genes de respuesta al estrés.

La infección previa con IAV disminuye el número de neumococos intracelulares localizados en vesículas acídicas

Está bien descrito, que la infección de células epiteliales con IAV, produce una disrupción en el flujo de vías degradativas como por ejemplo la autofagia. En relación a esta observación, se planteó el interrogante de si el bloqueo de la fusión de vesículas autofágicas con lisosomas producido por IAV, puede ser la causa del aumento en la supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* en células epiteliales. Por dicho motivo, se decidió evaluar el porcentaje de bacterias intracelulares localizadas en vesículas acídicas tanto en células A549 previamente infectadas con IAV y células sin previa infección viral. Mediante microscopía confocal, se pudo determinar que el número de bacterias intracelulares (marcadas con DAPI) que colocalizan con vesículas acídicas (marcadas con LysoTracker Deep Red), a 3 horas post-infección, disminuye en las células A549 previamente infectadas con IAV (Figura 17). Este resultado indica que la infección con IAV produce una disminución en el número de bacterias que se encuentran en vesículas lisosomales, al menos en los tiempos ensayados. En este contexto, *S. pneumoniae* estaría menos expuesto a la degradación lisosomal. Sin embargo, ésto puede resultar en un mayor tiempo de estadía en compartimentos vesiculares con pH ácidos subletales, resaltando la importancia del desarrollo de un proceso adaptativo eficaz por parte de neumococo.

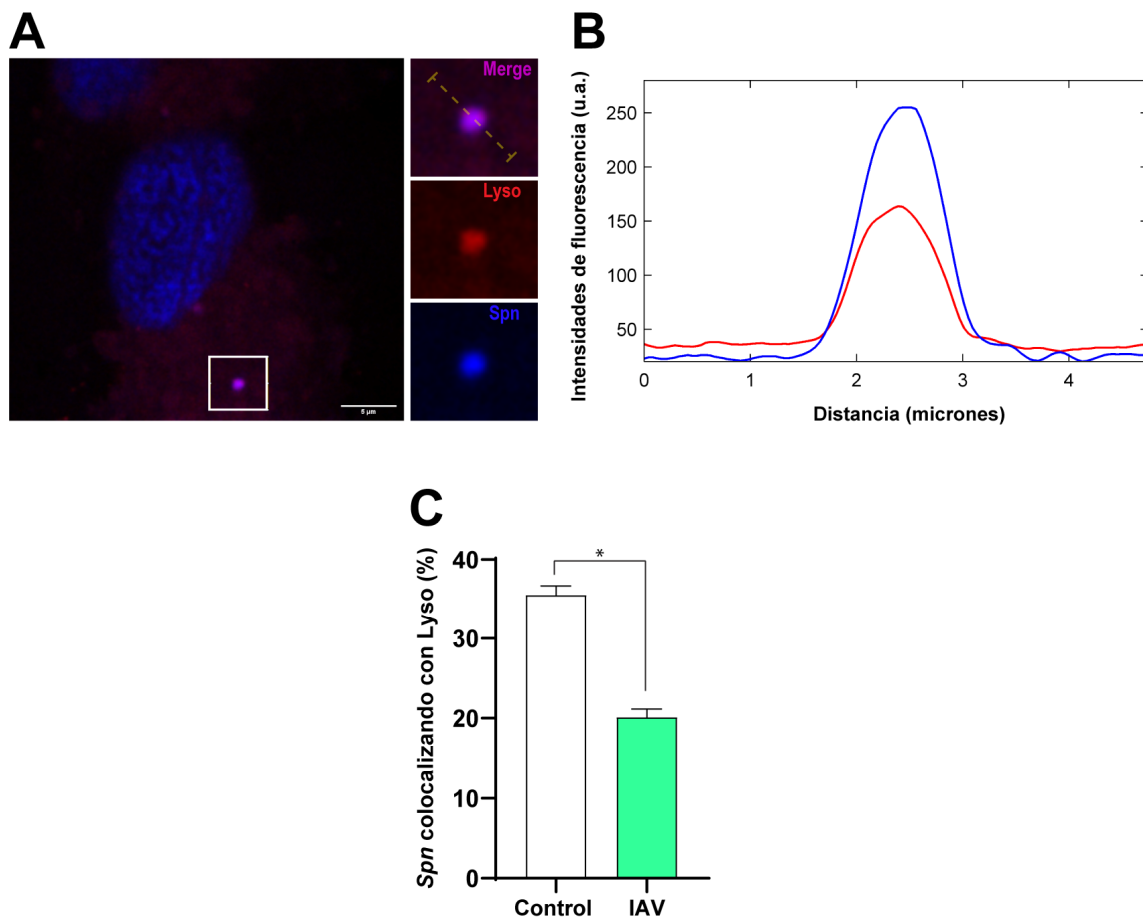


Figura 17. Células A549 previamente infectadas con IAV presentan un porcentaje disminuido de *S. pneumoniae* colocalizando con lisosomas. A) Imagen representativa obtenida en microscopio confocal que muestra la colocalización de *S. pneumoniae* (*Spn*), marcado con DAPI, con LysoTracker, a 3 h post-infección (hpi), en células A549. Las células infectadas previamente con IAV y células control, fueron infectadas con *Spn* y tratadas luego con el fluoróforo acidotrópico LysoTracker Deep Red. El evento mostrado corresponde al plano Z n° 21 (de 35 planos totales). La barra de escala corresponde a 5 μ m. **B)** El perfil de trazado multicanal corresponde a la línea amarilla en el recuadro del *merge* de los dos colores, y denota las intensidades de fluorescencia (expresadas en unidades arbitrarias, u.a.) de LysoTracker (rojo) y de *Spn*-teñido con DAPI (azul). **C)** Cuantificación las bacterias intracelulares que colocalizan con LysoTracker en células control y células infectadas con IAV, a 3 hpi. La barra blanca corresponde a células sin previa infección con IAV (control) y la barra a verde a células infectadas con IAV. El $n \geq 100$ bacterias intracelulares por coverslip. Los valores representan la media \pm SEM de tres réplicas. El test estadístico utilizado fue *el Student's t-test* (* $p < 0.05$).

VisRH participa en la respuesta de neumococo al estrés oxidativo

En la primera parte de este trabajo se encontró que la producción de H_2O_2 y la resistencia al estrés oxidativo impactan en la supervivencia intracelular de *S. pneumoniae*, y que estos procesos están regulados por la vía StkP/ComE. Otros autores demostraron que la respuesta al estrés oxidativo se

encuentra también controlada por el TCS04 (McCluskey et al. 2004), lo que sugiere que esta regulación es compleja y que probablemente otros sistemas de transducción de señales podrían estar participando. Para determinar si VisRH cumple algún papel en la respuesta al estrés oxidativo de *S. pneumoniae*, se procedió a examinar la resistencia al H₂O₂ de la mutante $\Delta visR$ incubando las bacterias en medio BHI conteniendo 20 mM de H₂O₂ durante 1 h. Se encontró que la sobrevivencia de esta mutante disminuyó aproximadamente 25 veces en comparación a la cepa *wt*, mientras que la cepa revertante *wr visR⁺* mostró una resistencia al H₂O₂ similar a *wt* (Figura 18). Esto indica que VisRH también estaría relacionado con la respuesta al estrés oxidativo. Como control, se utilizó la mutante $\Delta sodA$, una cepa deficiente en superóxido-dismutasa y, por ende, mucho más susceptible a un ambiente oxidativo, como ha sido probado en otros trabajos donde se demuestra una mayor sensibilidad frente al H₂O₂ (McAllister et al. 2004; Yesilkaya et al. 2000). En nuestro modelo se pudo confirmar estas observaciones, donde esta mutante resultó ser aún más sensible que $\Delta visR$ (Figura 18).

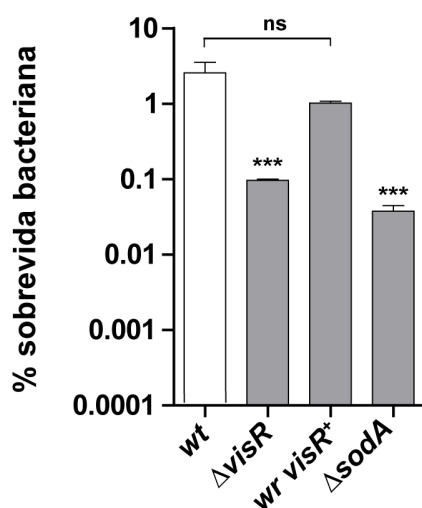


Figura 18. La mutante $\Delta visR$ es sensible al H₂O₂. Las células $\Delta visR$, *wr visR⁺*, $\Delta sodA$ y *wt* se cultivaron en BHI y luego se expusieron en medio BHI que contenía H₂O₂ 20 mM durante 1 h. Luego, las células viables se determinaron mediante el recuento de UFC de distintas diluciones en placas de agar sangre BHI, luego de 16h de incubación a 37°C. Se grafica un ensayo representativo de al menos 3 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm DE de triplicados. El análisis estadístico utilizado fue *Anova* de una vía, seguido de Test Post Hoc *Tukey* ($p \leq 0,001$ ***).

Se sabe que las células A549 infectadas con IAV presentan una producción de ROS aumentada y un trastorno de la defensa antioxidante (Komaravelli and Casola 2014; Khomich et al. 2018). Por

medio de citometría de flujo, se midieron los niveles intracelulares de ROS utilizando la sonda H₂DCF-DA, y se pudo reproducir dicha respuesta en nuestro modelo. Se encontró que la producción de ROS aumentó un 33% en las células infectadas con IAV en comparación con las células sin infectar (Figura 19). En este contexto, se puede suponer que el estrés oxidativo inducido por IAV podría alterar el mecanismo sinérgico entre IAV y *S. pneumoniae*.

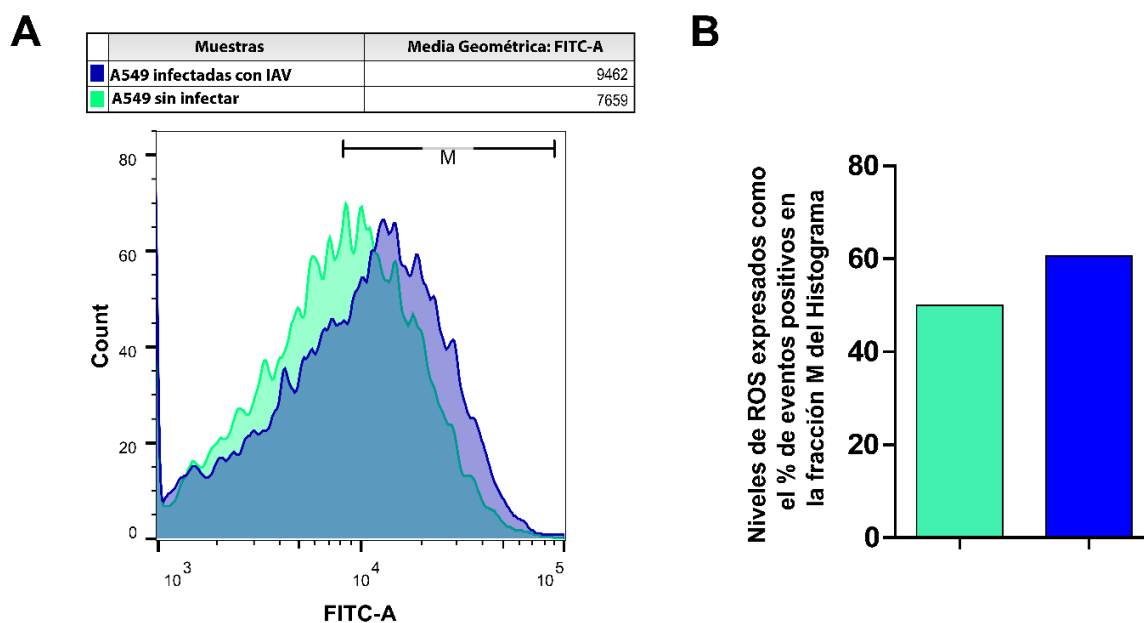


Figura 19. Confirmación de que IAV induce la producción de ROS en células A549. A) Histograma de citometría de flujo representativo, en el que el número de eventos se grafican en función de los niveles de intensidad de fluorescencia de la sonda H₂DCF-DA. Se muestran los histogramas de células A549 infectadas con IAV y células sin infectar. **B)** Gráfico de barras que muestra los resultados de las células A549 infectadas con IAV en comparación con las células no infectadas. Los datos corresponden a un experimento representativo de 3 ensayos independientes.

Para abordar este punto, se determinó la supervivencia intracelular de las cepas $\Delta visR$, $\Delta sodA$ y *wt* en células A549 infectadas con IAV y se comparó con células sin infectar con el virus. Tanto las mutantes $\Delta visR$ como $\Delta sodA$ mostraron una tasa de supervivencia similar en células no infectadas e infectadas con IAV (Figura 20), lo que sugiere que la respuesta de la bacteria frente al estrés oxidativo causado por el virus sería de suma importancia para que se establezca efectivamente un mecanismo de sinergia entre el virus y la bacteria a nivel intracelular. En ese contexto, VisR estaría ejerciendo un rol crucial para la adaptación de neumococo a nuevo entorno con un desbalance en el estado de óxido-reducción celular.

Una vez analizado el efecto de IAV en el incremento en la producción de ROS, se evaluó el impacto de la inhibición de la producción de ROS en el mecanismo de supervivencia intracelular de *S. pneumoniae*. Para este propósito, las células A549 fueron tratadas con 5 mM N-acetil-L-cisteína (NAC), un potente inhibidor de ROS que reduce el estrés oxidativo mediante la restauración de los niveles de glutatión reducido (GSH), el aumento de la actividad de superóxido dismutasa y la eliminación de radicales libres de hidroxilo (Paul et al. 2017). El tratamiento con NAC de las células A549 se realizó 1 h antes de la infección neumocócica y se encontró que la cepa *wt* sobrevivió casi 2 veces más en comparación con las células A549 no tratadas con NAC. La supervivencia intracelular de Δ *sodA* se vio beneficiada por la reducción del nivel de ROS (Figura 20). En contraste, la mutante Δ *visR* demostró ser insensible tanto a la alta producción de ROS (inducida por IAV) o a la baja biosíntesis de ROS (inhibida por NAC) cuando se determinó la supervivencia intracelular. Estos resultados permiten proponer que neumococo, a través del TCS VisRH, necesita adaptarse al ambiente ácido presente en los compartimentos vesiculares y al mismo tiempo defenderse del estallido oxidativo causado por la infección previa con IAV en un contexto de coinfección.

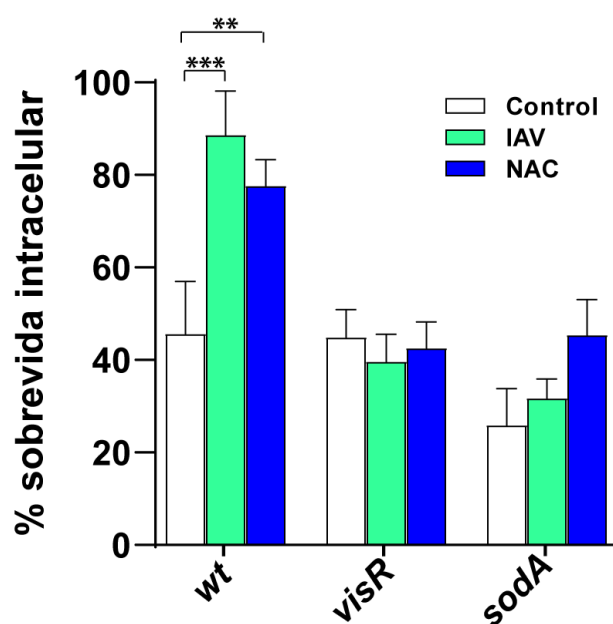
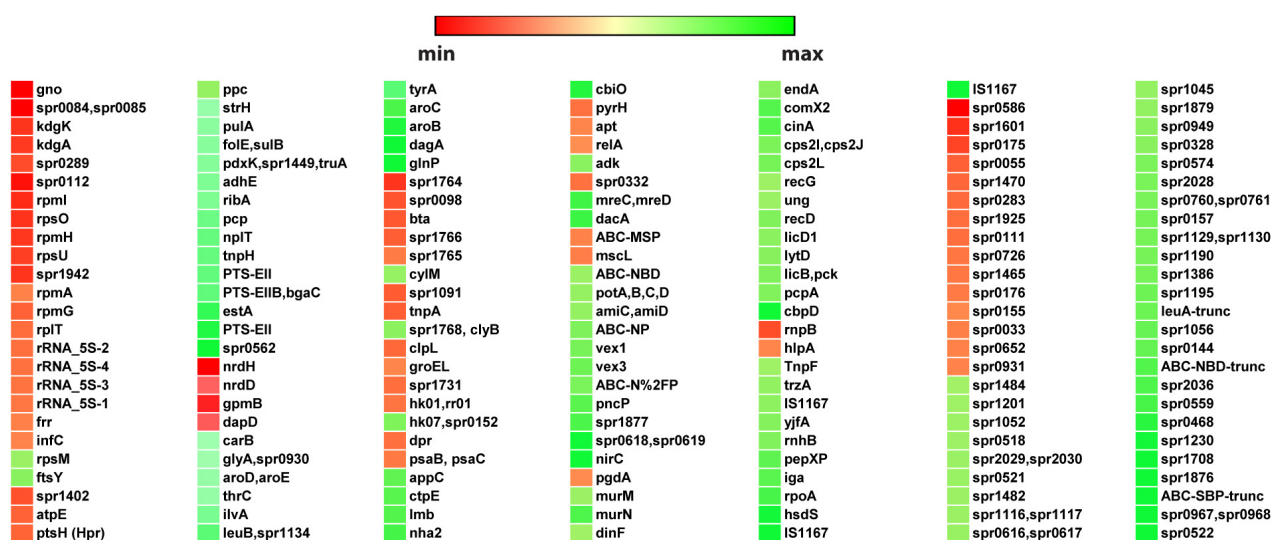


Figura 20. La inhibición de la producción de ROS no afecta la supervivencia intracelular reducida del mutante Δ *visR*. Las células A549 se infectaron con las células Δ *visR*, Δ *sodA* y *wt* y se determinó la supervivencia intracelular como se describió anteriormente. Las barras blancas corresponden a células no infectadas por virus, las barras verdes a células infectadas con IAV y las barras azules a células tratadas con NAC. Los valores representan la media \pm DE de un experimento representativo de tres ensayos independientes. El test estadístico utilizados fue *Anova de una vía*, seguido de *Test Post Hoc Tukey* (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

VisRH regula la expresión de genes relacionados al estrés

En bacterias, se ha demostrado que los reguladores de respuesta, que pertenecen a sistemas de dos componentes, controlan la expresión génica para desarrollar una respuesta adaptativa a las condiciones de estrés (Jacob-Dubuisson et al. 2018). Teniendo en cuenta los fenotipos relacionados con la respuesta al estrés ácido y oxidativo de la mutante $\Delta visR$, se propuso que VisR regula la expresión de los genes de estrés. Para identificar genes regulados por VisR, comparamos los transcriptomas de las cepas $\Delta visR$ y *wt* mediante análisis de RNA-seq. Estas cepas se cultivaron en medios acidificados en la fase de crecimiento exponencial, y el ARN total se purificó y analizó como se describió en la primera parte, cuando se analizó el transcriptoma de la cepa mutante *comE^{T128A}* (Pinas et al. 2018). El análisis del transcriptoma de esta cepa mutante reveló la expresión diferencial de 179 genes en condiciones ácidas, de los cuales 65 estaban regulados negativamente, mientras que 114 mostraron regulación positiva (Figura 21A). En base a este análisis de expresión génica diferencial, se pudo constatar que VisR controla, directa o indirectamente, la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés como son los que codifican chaperonas moleculares y proteínas que controlan la homeostasis redox, así como genes involucrados en el transporte de cationes y metabolitos, biosíntesis de la pared celular, biosíntesis de aminoácidos y de purina/pirimidina, metabolismo central, estructuras ribosómicas y de traducción, entre otros (Figura 21B).

A



B

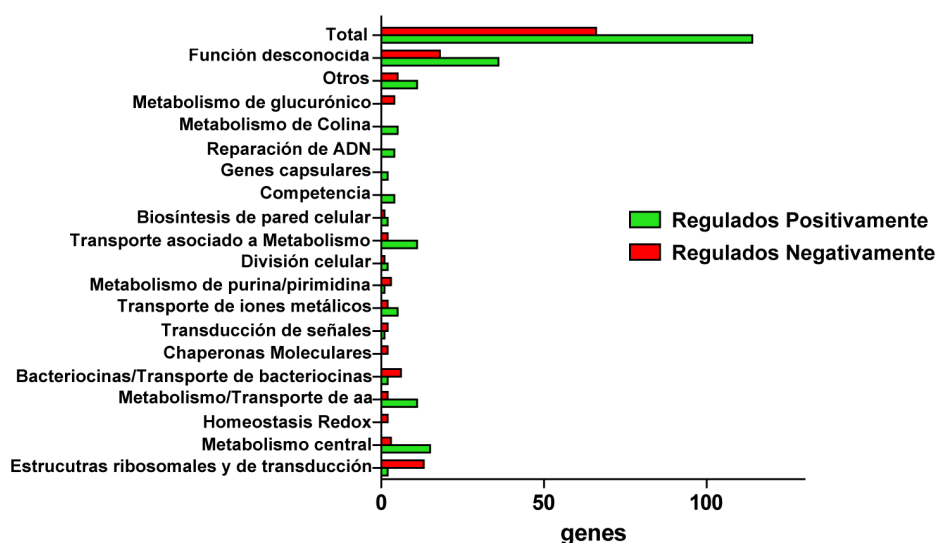


Figura 21. VisR regula la expresión de un gran número de genes a pH ácido. A) Mapa de calor del RNA-seq que muestra la expresión génica relativa de la cepa $\Delta visR$ respecto a la cepa *wt* en condiciones ácidas. La cantidad relativa de cada transcrito está representada como el \log_2 de las veces de cambio. Los colores rojos y verdes indican expresión disminuida y aumentada, respectivamente, en la cepa $\Delta visR$ con respecto a la cepa *wt*. Diferencias en la expresión génica ≥ 2 y con un $P \leq 0,05$ fueron considerados como significativos. **B)** Categorías de genes regulados por VisR obtenidos de un análisis de RNAseq. Una distribución generada por RNA-seq en categorías funcionales de genes que están regulados diferencialmente en la mutante $\Delta visR$ en condiciones ácidas.

En general, la lista completa de los genes regulados por VisR (Tabla S4 en Anexos) indicó que este TCS, tan pobremente caracterizado hasta el momento, induce cambios globales en el transcriptoma del neumococo, pero focalizamos nuestro estudio en los genes de estrés. Mediante RT-qPCR, confirmamos una disminución en la expresión de los genes *visH* (17.9 veces), *clpL* (3.9 veces) y *psaB* (2.4 veces), y una mayor transcripción de *murN* (2.3 veces), *glyA* (3.2 veces) y *aroC* (3 veces) en la mutante $\Delta visR$ en comparación con *wt* (Figura 22). El gen *clpL* codifica para una chaperona molecular (proteína de *shock* térmico) involucrada en la respuesta al estrés (Kwon et al. 2003; Nguyen et al. 2014), *murN* codifica para una enzima de biosíntesis de la pared celular (Filipe and Tomasz 2000), *glyA* codifica para una glicina hidroximetil-transferasa (Hartel et al. 2012), *psaB* codifica para una subunidad de un transportador ABC de manganeso relacionado con la resistencia oxidativa (McAllister et al. 2004; McCluskey et al. 2004), y *aroC* codifica para la corismato-sintasa involucrada en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en bacterias (Hartel et al. 2012).

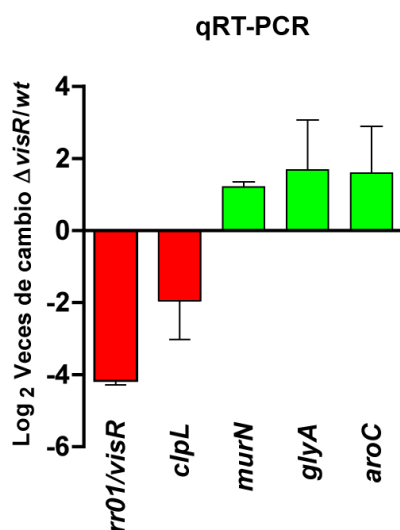


Figura 22. Los genes regulados por VisR putativos expresados en la mutante $\Delta visR$ en relación con la cepa wt. La expresión génica determinada por RNAseq fue confirmada por qPCR. Las cepas $\Delta visR$ y wt se cultivaron en BHI hasta la fase exponencial media por triplicado y luego se incubaron en MD5/pH 5,9 durante 1 h. El cambio en la expresión génica se midió por RT-qPCR y se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El gen *gyrA* se utilizó como control interno. Los valores representan la media \pm DE de al menos 3 réplicas.

Análisis del proteoma de neumococo cultivado en condiciones ácidas

Para determinar una posible correlación entre la transcripción y los niveles de proteína, se compararon los proteomas de la mutante $\Delta visR$ y de la cepa wt. Se utilizaron extractos proteicos de ambas cepas cultivadas a pH 5,9. Mediante LC-MS/MS, 925 proteínas fueron detectadas en total, encontrando una expresión diferencial de más de 2 veces de cambio y un $p < 0,05$ en 66 de ellas. Los niveles de expresión de 33 proteínas se encontraban disminuidos mientras que otras 33 proteínas se encontraban sobre expresadas (Figura 23 A). Cabe mencionar que algunas proteínas sólo fueron detectadas en la mutante y otras solamente en la cepa wt. Además, se pudo confirmar la ausencia de expresión de VisR en la mutante $\Delta visR$. La lista completa de proteínas expresadas diferencialmente está disponible en la Tabla S5 (Anexos).

Cuando estos datos se compararon con los obtenidos mediante el análisis RNA-seq, se pudo observar una correlación entre la expresión de los transcritos de los genes *clpL*, *psaB*, *dpr* (codifica una ferritina que contiene hierro) (Hua et al. 2014), *trxA* (codifica una tiorredoxina) (Jacob et al. 2011), *groES* (codifica para chaperonas moleculares) (Kim et al. 2001) y *nrdD* (codifica para una ribonucleótido-reductasa) (Dreux et al. 2015) con la expresión de sus correspondientes proteínas

codificadas (Figura 23 B). Uno de los puntos que hay que resaltar es que la expresión de ClpL y PsaB están reprimidas en la mutante $\Delta visR$, y estas proteínas han sido involucradas previamente en la respuesta al estrés ácido y oxidativo en *S. pneumoniae* (Choi et al. 1999; Kwon et al. 2003; Tu le et al. 2007; McCluskey et al. 2004).

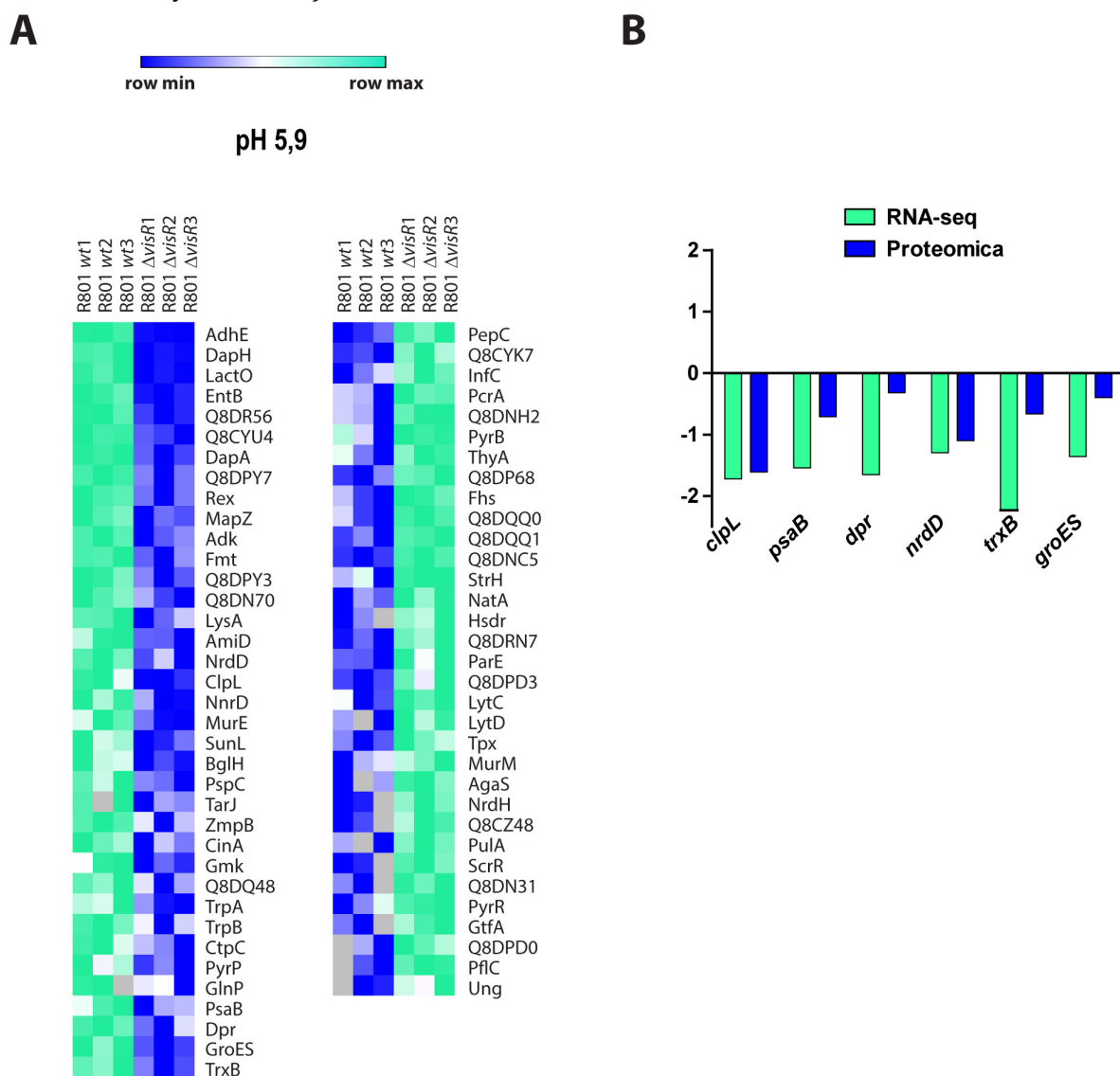


Figura 23. Análisis proteómico comparativo de proteínas expresadas diferencialmente en la mutante $\Delta visR$ en comparación con wt en condiciones ácidas. A) Mapa de calor de proteínas expresadas en la mutante $\Delta visR$ y referidas a wt. Las proteínas con un cambio en su expresión mayor a 2 y un valor $p < 0,05$ se consideraron expresadas diferencialmente. Una mayor expresión en wt se muestra en tonos de verde, y una mayor expresión en el mutante $\Delta visR$ se muestra en tonos de azul. **B)** Comparación entre el cambio de expresión ($\Delta visR$ /wt) obtenido por análisis RNaseq (barras verdes) y proteómico (barras azules). Valores expresados como Log_2 de las veces de cambio.

Con estos datos, se concluyó que existe una expresión diferencial en la mutante tanto a nivel de transcriptos como a nivel proteico. Sin embargo, no se puede determinar si VisRH está participando en la regulación de la expresión génica (principalmente de los genes relacionados a estrés), solamente a pH ácido, o si también también lo hace en condiciones no estresantes. Para tal fin, se procedió a comparar los proteomas de ambas cepas, cultivadas a pH 7. En estas condiciones, se hallaron un total de 59 proteínas con un cambio mayor a 2 veces y un $p < 0.05$, donde 36 de ellas estaban sobreexpresadas en la cepa $\Delta visR$ y 23 presentaban una expresión disminuida (Figura 24A y tabla S6). Si bien, el patrón de proteínas expresadas diferencialmente en $\Delta visR$ presentó variaciones entre ambas condiciones, el perfil de expresión de las proteínas relacionadas al estrés era similar. Por ejemplo, ClpL, PsaB, Dpr, NrdD y GroES presentan, en la mutante, una disminución en su expresión tanto a pH 7 como a pH 5,9 (Figura 24B). Esto sugiere que la participación del sistema VisRH en la regulación de estas proteínas es independiente de la acidificación del entorno en el que se encuentra *S. pneumoniae*.

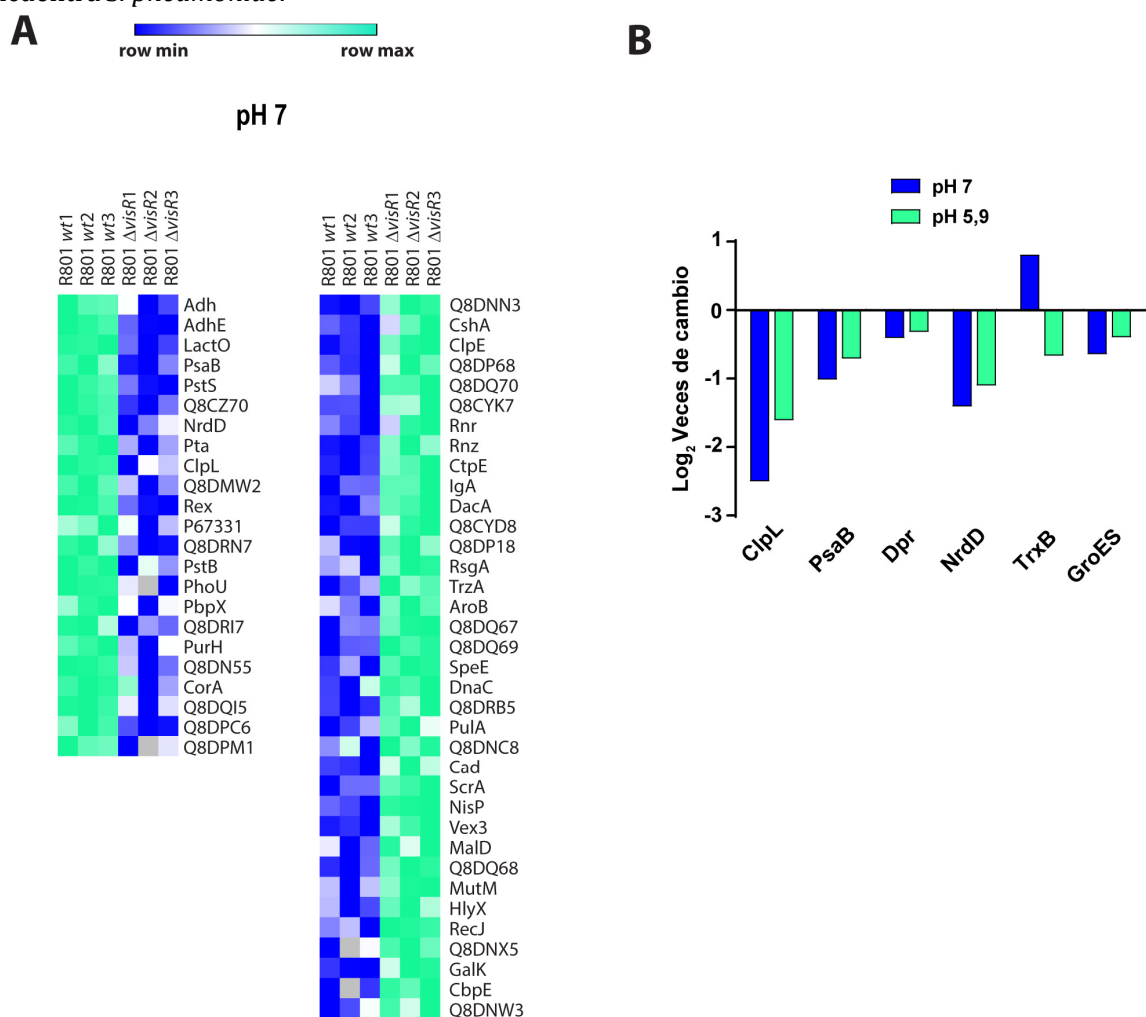


Figura 24. Análisis comparativo del proteoma entre $\Delta visR$ y wt a pH 7. A) Mapa de calor de proteínas expresadas en la mutante $\Delta visR$ y referidas a wt a pH 7. Las proteínas con un cambio en su expresión mayor a 2 y un valor $p < 0,05$ se consideraron expresadas diferencialmente. Una mayor expresión en wt se muestra en tonos de verde, y una mayor expresión en el mutante $\Delta visR$ se muestra en tonos de azul. **B)** Comparación entre el cambio de expresión ($\Delta visR$ /wt) de proteínas relacionadas al estrés tanto a pH 7 (barras azules) como a pH 5,9 (barras verdes). Valores expresados como \log_2 de las veces de cambio. El procesamiento de los datos de proteómica fue realizado usando el software Proteus. El test estadístico usado fue *Student's t-test*. Todos los cambios mostrados en este panel fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

ClpL y PsaB están involucrados en la respuesta neumocócica al estrés y en el mecanismo sinérgico entre IAV y S. pneumoniae

En base a los resultados obtenidos mediante ensayos de transcriptómica y proteómica, los que indicaron que ciertos genes de estrés se encuentran bajo control de VisRH, enfocamos nuestro estudio en dos genes en particular, *clpL* y *psaB*. El gen *clpL* codifica para una chaperona que se induce por estrés térmico (Choi et al. 1999; Park et al. 2015). Al analizar los datos de la proteómica comparativa entre los distintos pH, se observó que la expresión de la proteína ClpL es fuertemente inducida cuando las bacterias son incubadas en condiciones ácidas. Cuando las cepas wt y $\Delta visR$ se enfrentan a pH 5,9, los niveles de esta proteína aumentaron 200 y 300 veces, respectivamente, en relación a las mismas cepas cultivadas a pH 7 (Figura 25A).

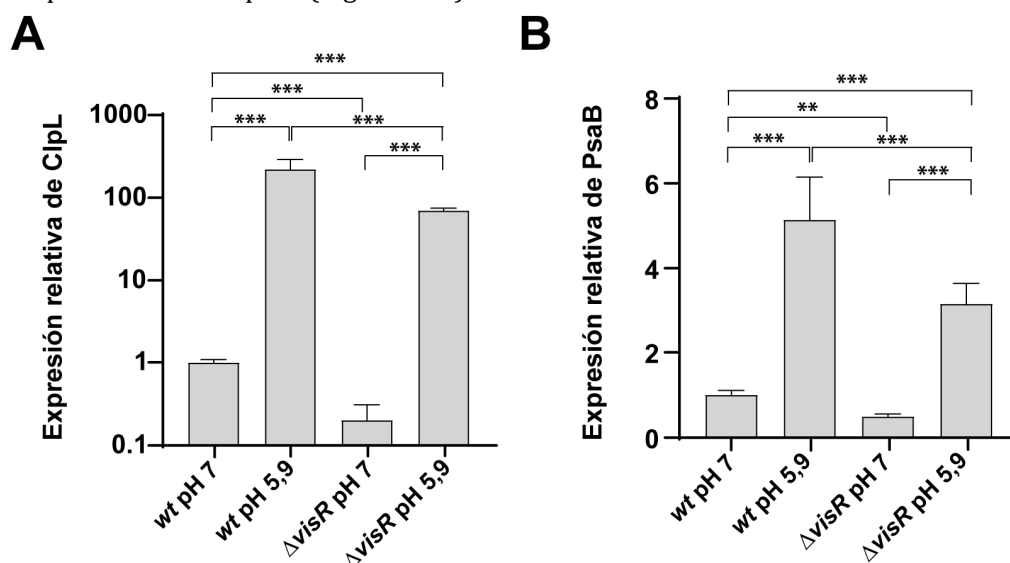


Figura 25. Los niveles de ClpL y PsaB aumentan a pH ácido. A, B) Niveles de las proteínas ClpL (A) y PsaB (B) a pH 7 y pH 5,9. Los datos de proteómica fueron analizados entre los distintos pH. Las cantidades de ClpL (A) y de PsaB (B) en la cepa *wt* cultivada a pH 7 se expresan como 1, y los niveles de expresión de las demás muestras son relativizadas a esa condición. Cada una de las muestras fueron realizadas por triplicado. Los datos fueron analizados utilizando el software para análisis de proteómica Perseus. Los valores representan la media \pm DE de tres réplicas. El análisis estadístico usado fue el *Student's t-test* (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

De manera similar, la expresión de PsaB también es inducida cuando ambas cepas son incubadas a pH ácido, sin embargo, estos cambios no son tan grandes como sucede con ClpL (Figura 25B). Estos datos evidencian que en el aumento de la expresión de estas proteínas en condiciones ácidas otros reguladores están participando además del TCS VisRH.

Adicionalmente, en nuestro laboratorio se disponía de evidencia experimental previa indicando que ClpL es una de las principales proteínas que se induce bajo estrés ácido. Mediante análisis por SDS-PAGE de extractos proteicos de bacterias cultivadas a pH 7,8 o a pH 5,9, se identificó una banda de 78 kDa que se expresa mayoritariamente bajo condiciones ácidas. La secuenciación de esta banda proteica reveló dos péptidos de 11 y 14 aminoácidos con una homología del 100% con la secuencia de aminoácidos de ClpL. Analizando el genoma de *S. pneumoniae*, se predice que el gen *clpL* codifica para una proteína de alrededor de 701 aminoácidos y un peso molecular teórico de 77,6 kDa, en línea con nuestras observaciones en SDS-PAGE con la banda de 78 kDa.

Para analizar los niveles de transcripción del gen *clpL* en cultivos acidificados, la cepa *wt* se expuso a pH 5,9 o pH 7,8 durante 1 h. Mediante qRT-PCR se detectó un aumento de 70 veces de los transcritos de *clpL* a pH 5,9 (Figura 26), lo que indica que el aumento en la expresión de ClpL está vinculado a cambios adaptativos a nivel transcripcional que se desencadenan en condiciones ácidas.

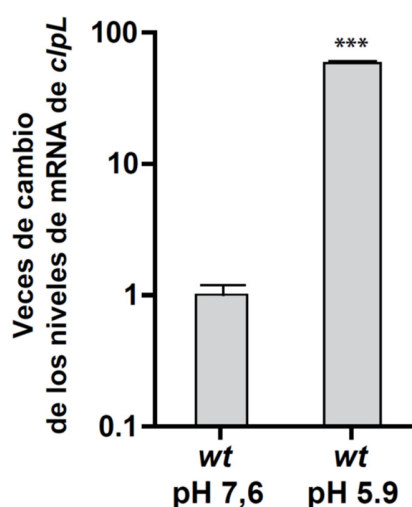


Figura 26. Los niveles de transcripción del gen *clpL* aumentan a pH ácido. Las células wt se cultivaron en BHI / pH 7,8 hasta la fase exponencial media y luego fueron cultivadas por 1h en MD5/pH 5,9 o en medio MD6/pH7,6. En este punto se extrajeron los ARN totales de cada muestra. Las veces de cambio en la expresión génica se midió por qRT-PCR y se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El gen *gyrA* se utilizó como control interno. Las barras representan la media \pm DE de tres réplicas. Este resultado es representativo de tres experimentos realizados de manera independiente. El método estadístico utilizado fue t-student. Las diferencias significativas se indican como: *** $p < 0,001$.

Para determinar la contribución de ClpL en nuestro modelo de infección celular, se generó la mutante $\Delta clpL$ utilizando la técnica de mutagénesis por delección con cassette Janus. Replicando el experimento de tolerancia al estrés ácido *in vitro* mencionado previamente, observamos una disminución de 10^4 veces en su tolerancia a medios acidificados (THYE pH 4,8 durante 1 h) en comparación con la cepa salvaje (Figura 27A). La mutante $\Delta clpL$ exhibió un comportamiento similar al de la mutante $\Delta visR$ frente al estrés ácido. Cuando las células A549 se infectaron con la mutante $\Delta clpL$, su capacidad de supervivencia intracelular fue similar a la de la cepa wt. Sin embargo, cuando las células A549 se trataron con Bafilomicina A1 100 nM o se infectaron previamente con IAV, situaciones en las que la bacteria prolongaría su estadía en vesículas (endosomas o autofagosomas) sin alcanzar los lisosomas, esta mutante fue incapaz de aumentar la proporción de bacterias viables (Figura 27B). En conjunto, estos hallazgos indican que ClpL estaría involucrado en la respuesta al estrés ácido, que a su vez es necesaria para una mayor supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* en los neumocitos infectados con IAV.

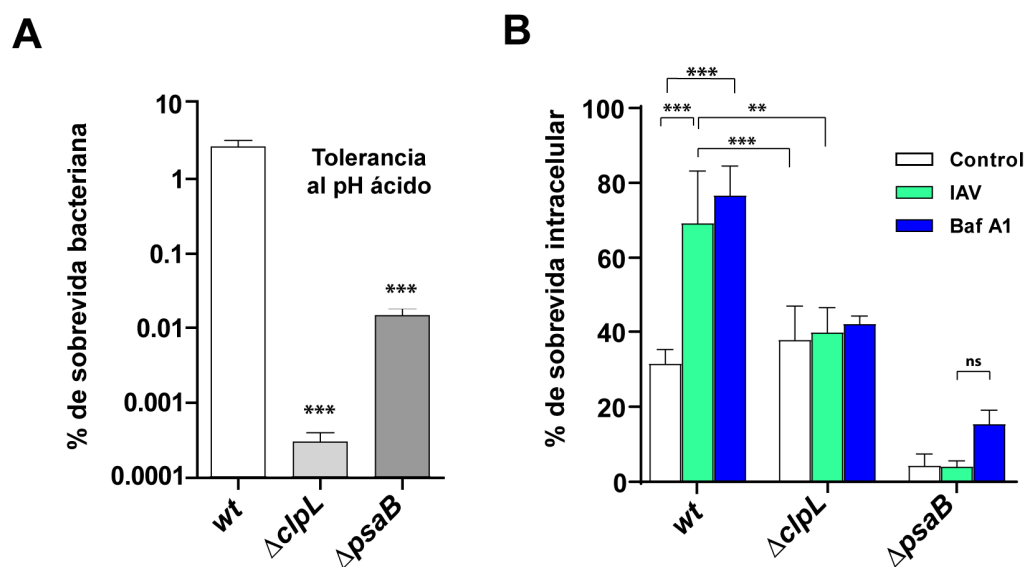


Figura 27. ClpL y PsaB median la respuesta al estrés ácido en *S. pneumoniae*. **A)** Las mutantes $\Delta clpL$ y $\Delta psaB$ son susceptibles a los medios acidificados. Las cepas $\Delta clpL$, $\Delta psaB$ y *wt* se cultivaron en BHI hasta un DO_{620nm} 0,3 y luego se incubaron en medio MD5 a pH 4,8 durante 1 h. Luego, las células viables se cuantificaron mediante el recuento de UFC en placas de agar BHI suplementado con sangre luego de 16h de incubación a 37°C. **B)** Las mutantes $\Delta clpL$ y $\Delta psaB$ exhiben una supervivencia intracelular disminuida en neumocitos. Las células A549 se infectaron con las células de las cepas $\Delta clpL$, $\Delta psaB$ y *wt*. Los porcentajes de sobrevida se calcularon considerando la cantidad total de bacterias internalizadas después de 30 minutos de tratamiento antibiótico extracelular, como el 100% de sobrevida para cada cepa. Después del tratamiento con antibióticos extracelulares, se tomaron muestras a las 0 y 2 hs, y los neumocitos se lisaron para liberar neumococos y realizar recuento de bacterias viables. Las barras blancas corresponden a células no infectadas por virus, las barras verdes a células infectadas con IAV y las barras azules a células tratadas con Bafilomicina A1. En ambas figuras, los valores representan la media \pm DE de un ensayo representativo de 3 experimento independientes. El test estadístico usado fue *Anova de una vía*, seguido de *Test Post Hoc Tukey* (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

En base a los resultados de expresión diferencial, además de *clpL*, nos interesó analizar la contribución de otro gen relacionado a respuesta al estrés. El gen *psaB* codifica para la subunidad intracitoplasmática del transportador de manganeso (Mn^{2+}) del tipo ABC en *S. pneumoniae*. Se ha descrito que la mutante $\Delta psaB$ presenta una mayor sensibilidad al estrés oxidativo (McAllister et al. 2004), y por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la carencia de *psaB* podría influir en la sobrevida intracelular de *S. pneumoniae* durante la coinfección con IAV, debido a que este virus induce la producción de ROS. Para comprobar esto, se construyó la mutante $\Delta psaB$ y se midió su susceptibilidad al estrés oxidativo. La mutante $\Delta psaB$ presentó una sensibilidad aumentada al H_2O_2 20 mM, 10^4 veces más sensible que la cepa *wt*, en consonancia con lo descrito previamente (McAllister et al. 2004; Yesilkaya et al. 2000) (Figura 28A). Además, al analizar el fenotipo de esta mutante en los ensayos de tolerancia al estrés ácido, se pudo determinar que *psaB* también es importante para desarrollar una respuesta al estrés ácido (Figura 27A), mostrando una disminución de 10^4 veces con respecto a la cepa *wt*. En contraste con la mutante $\Delta clpL$ y con la cepa *wt*, $\Delta psaB$ sí mostró tener una menor capacidad de sobrevivir intracelularmente (Figuras 27B, 28B). Al evaluar las consecuencias de los cambios producidos por la infección con IAV y el tratamiento con Bafilomicina, se encontró que $\Delta psaB$ no responde a dichos efectos, evidenciando un compromiso de su capacidad de adaptarse a estas condiciones (Figura 27B).

Curiosamente, la mutante $\Delta clpL$ también evidenció una reducción en la susceptibilidad al H_2O_2 de 200 veces en comparación con la cepa *wt*, poniendo de manifiesto que esta chaperona no sólo es una proteína de *shock* térmico, sino que también está involucrada en las respuestas al estrés ácido y oxidativo (Figura 28A). Sabiendo que tanto $\Delta clpL$ como $\Delta psaB$ presentan mayor sensibilidad al H_2O_2 , y para investigar la correlación de los hallazgos *in vitro* con lo que ocurre en el interior de las células,

se realizó el ensayo de infección en neumocitos tratados con NAC y en células infectadas previamente con IAV. Como se puede observar en la Figura 28B, ambas mutantes no mostraron una mayor supervivencia intracelular en células A549 infectadas con IAV o tratadas con NAC, lo cual se asemeja al fenotipo observado para el mutante $\Delta visR$. Estos resultados confirman que ClpL y PsaB también son necesarias para la adaptación de neumococo en células infectadas con el virus.

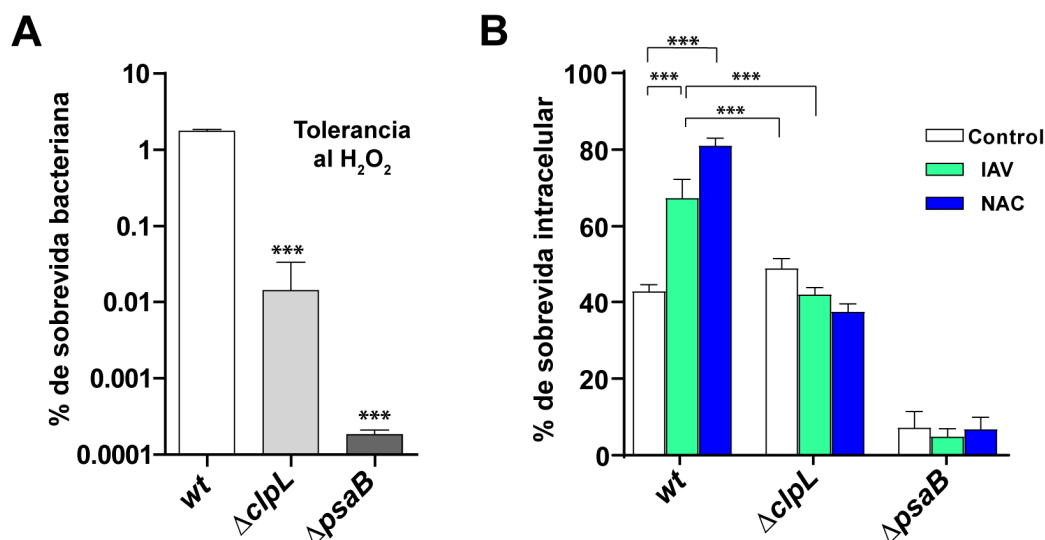


Figura 28. ClpL y PsaB median la respuesta al estrés oxidativo y participan en el mecanismo de sinergia con IAV en *S. pneumoniae*. **A)** Las mutantes $\Delta clpL$ y $\Delta psaB$ son susceptibles al H₂O₂. Las células $\Delta visR$, $\Delta sodA$ y wt se cultivaron en BHI hasta un DO_{620nm} 0,3 y luego se expusieron en un medio BHI que contenía 20 mM H₂O₂ durante 1 h. **B)** La inhibición de la producción de ROS no afecta la supervivencia intracelular deteriorada de los mutantes $\Delta clpL$ y $\Delta psaB$. Las células A549 se infectaron con las células $\Delta visR$, $\Delta sodA$ y wt y se determinó la supervivencia intracelular como se describió anteriormente. Las barras blancas corresponden a células no infectadas por virus, las barras verdes a células infectadas con IAV y las barras azules a células tratadas con NAC. Los valores de ambos gráficos representan la media \pm DE de un ensayo representativo de tres experimentos independientes. El test estadístico utilizado fue *Anova de una vía*, seguido de *Test Post Hoc Tukey* los paneles (**p < 0.01; ***p < 0.001).

El mecanismo sinérgico entre IAV y S. pneumoniae depende de la vía autofágica

Hasta el momento el análisis del mecanismo sinérgico existente entre ambos patógenos ha estado centrado principalmente en los factores moleculares de la bacteria que conducen a su adaptación en un ambiente gobernado por cambios inducidos por el virus. Pero, ¿cuáles son las alteraciones

celulares inducidas por IAV que propician un entorno más favorable para la supervivencia de neumococo?

En ensayos ya presentados en esta tesis (Figuras 16B, 27B), se observó que cuando las células A549 son tratadas con Bafilomicina A1 se genera un aumento en el número de bacterias viables intracelulares. Además de ser un potente inhibidor de la acidificación vesicular, este compuesto es un conocido inhibidor del flujo autofágico en etapas tardías, por lo que es ampliamente usado para estudiar este proceso (Yamamoto et al. 1998). Cuando se utilizó en nuestro modelo experimental para analizar su efecto sobre la supervivencia intracelular de neumococo en las células A549, descubrimos que producía un aumento significativo comparable al observado en células infectadas con IAV. En estas condiciones, la autofagia podría tener un papel en el efecto que causa IAV sobre la vida de intracelular de neumococo en células epiteliales.

Considerando trabajos previos en donde se describió que tanto IAV como *S. pneumoniae* inducen autofagia independientemente (Gannage et al. 2009; Li et al. 2015), que este patógeno bacteriano sobrevive en vesículas autofágicas (Ogawa et al. 2018; Surve et al. 2018) y que IAV bloquea la autofagia (Gannage et al. 2009; Ren et al. 2016), se decidió determinar el papel de la autofagia en nuestro modelo de coinfección. Para tal fin, y mediante microscopía de fluorescencia, se procedió a medir la inducción del proceso autofágico determinando el número de vesículas LC3 positivas en células A549. Para ello, se transfectaron neumocitos con un plásmido que expresa LC3 fusionada con el tándem de proteínas fluorescentes pHluorin-mKate2 (Tanida, Ueno, and Uchiyama 2014). Este tándem posibilita distinguir vesículas LC3 positivas que se encuentran acidificadas (al fusionarse con los lisosomas) de aquellas que no. Esto es posible, ya que mKate2 es un derivado de RFP que resiste al pH ácido, mientras que pHluorin es una variante de GFP que es sensible a dicho ambiente, por lo que deja de emitir fluorescencia. Como se puede apreciar en la Figura 29, hay un aumento significativo del número de vesículas LC3 positivas tanto en las células infectadas con IAV, como en células infectadas con neumococo y en células coinfectadas. Además, se observó un número considerablemente alto de vesículas LC3 doblemente marcadas (pHluorin + mKate2), indicando que esas vesículas autofágicas no se han fusionado con los lisosomas. Esto condice con lo descrito por otros autores acerca de la inhibición que IAV produce fusión autofagosoma-lisosoma (Gannage et al. 2009; Ren et al. 2016).

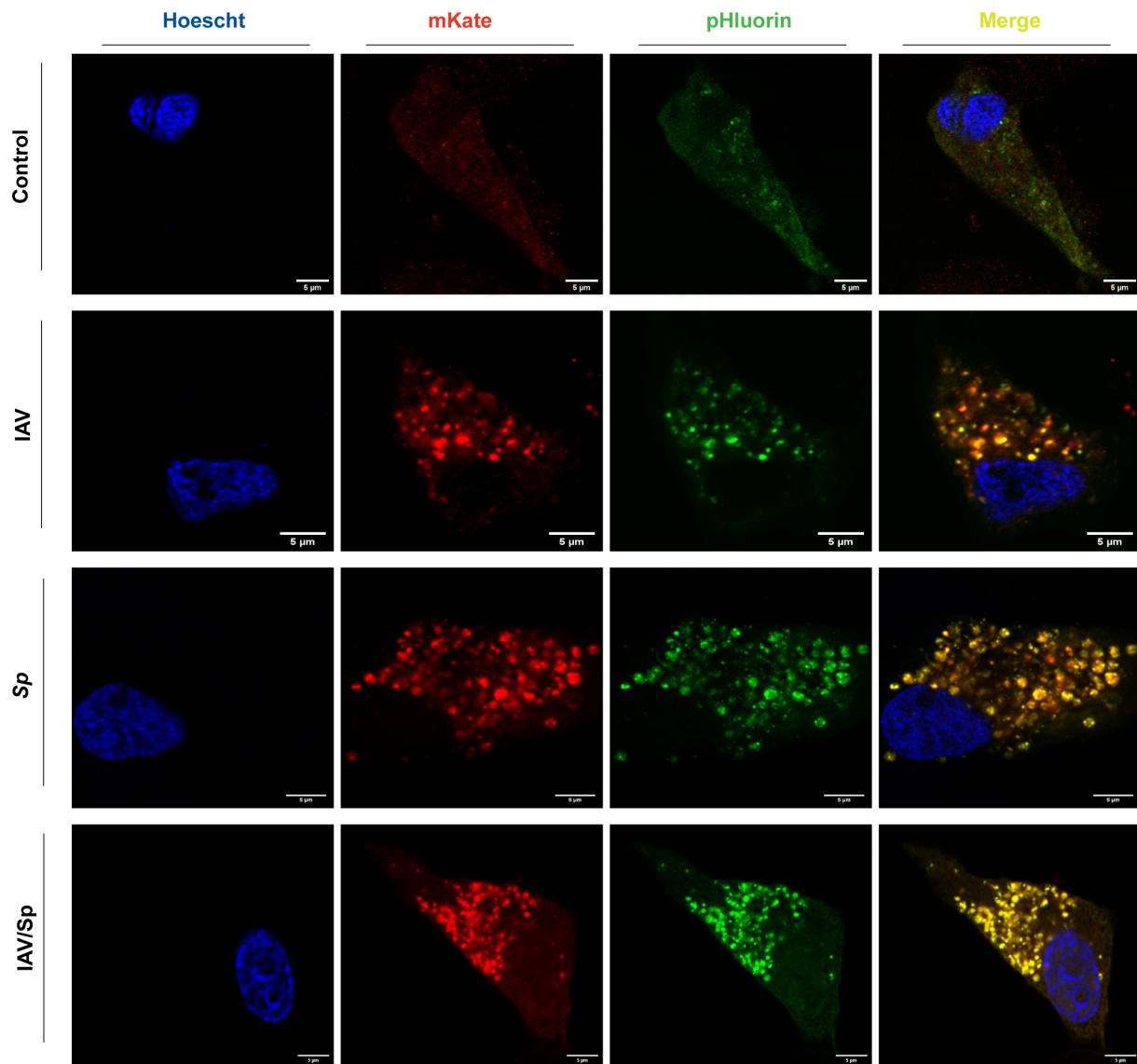


Figura 29. La inducción de autofagia ocurre en neumocitos infectados con IAV o *Sp* o en células coinfectadas. Las células A549 fueron transfectadas con un vector que expresa la proteína LC3 humana fusionada con el tándem de proteínas fluorescentes mKate2-pHluorin. A 24 y 48h post-transfección, las células fueron enfrentadas con IAV y *S. pneumoniae*, respectivamente. Se realizó un análisis cualitativo, por microscopía confocal, de la cantidad de vesículas LC3 positivas por célula. Cuando colocalizan las dos proteínas fluorescentes indica que la vesícula no ha sido fusionada con los lisosomas, mientras que las vesículas marcadas solamente con mKate2 (rojo) indica que poseen un pH ácido. Se observa un claro aumento del número de vesículas LC3 positivas en todas las células infectadas en relación con la situación control. Además, se puede observar un gran número de vesículas doblemente marcadas, lo que

sugiere que el proceso autofágico está bloqueado, principalmente en las células infectadas con IAV y coinfectadas. La barra de escala corresponde a 5 micras.

Adicionalmente, el proceso autofágico fue evaluado mediante ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra LC3-II y p62. Como control, células A549 fueron tratadas con bafilomicina A1 (Gagliardi, Rees, and Farina 1999; Yamamoto et al. 1998) para producir la inhibición de la fusión de los autofagosomas con lisosomas, con rapamicina (Jung et al. 2010) para inducir autofagia a través de la inhibición de mTor, y con ambas drogas para inducir el proceso autofágico e inhibirlo en etapas tardías. En los tres casos se puede observar un aumento en los niveles de LC3-II. Cuando las mismas células se infectaron con *S. pneumoniae*, IAV o fueron coinfectadas, se observaron niveles aumentados de LC3-II (Figura 30A-B). También encontramos que los niveles de p62 eran parecidos al control (Figura 30A-B). La proteína p62, también denominada SQSTM1, es considerada como una proteína cargo de las vesículas autofágicas que inexorablemente está destinada a la degradación lisosomal, por lo que niveles no disminuidos de la misma evidencian un bloqueo en el flujo de esta vía. Esto ya ha sido descrito para la infección por IAV (Perot et al. 2018).

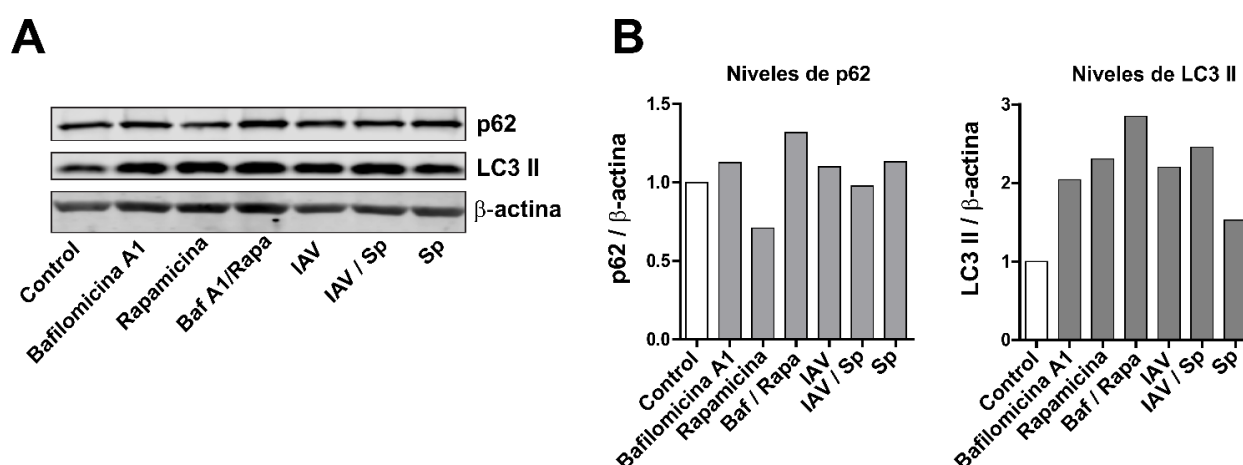


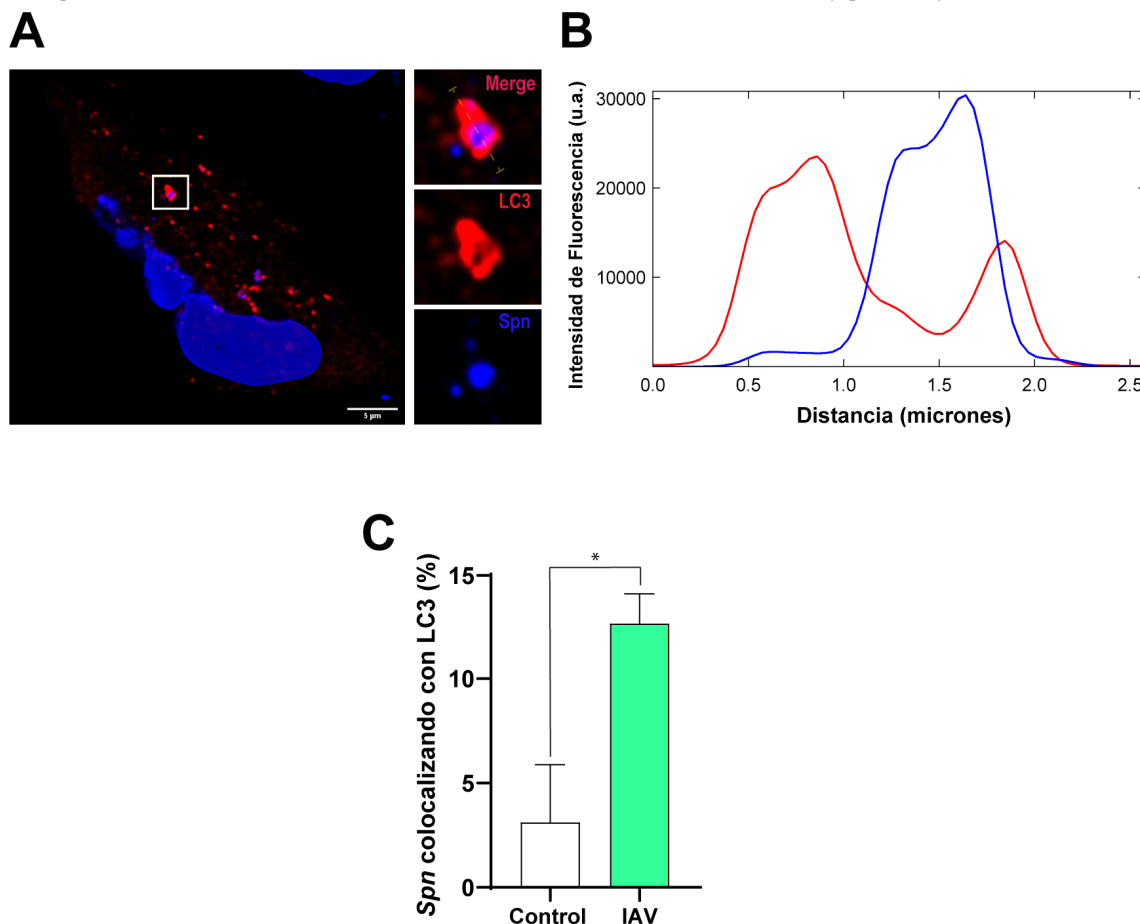
Figura 30. La infección con IAV, *Sp* o la coinfección IAV-*S. pneumoniae* produce la inducción de la vía autofágica. A) Los niveles de LC3-II aumentan en la coinfección con IAV y *S. pneumoniae*, mientras que los de p62 no disminuyen. Las células A549 fueron infectadas con IAV (MOI 10), con *S. pneumoniae* (MOI 30) o coinfectadas con ambos patógenos. Como controles, las células A549 también se trataron con inductores (rapamicina) e inhibidores (bafilomicina A1) del proceso de autofagia. **B)** Cuantificación de los niveles de p62 (panel izquierdo) y de LC3-II (panel derecho) a partir del Western Blot representado en A. La actina se utilizó como control de carga para normalizar. Los gráficos de barras representan la intensidad

relativa por densitometría de LC3-II (LC3-II/ β -actina) y la intensidad relativa de p62 (p62/ β -actina). Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Si bien ya se ha descrito que una subpoblación intracelular de neumococo se halla en vesículas autofágicas (PcAV, *pneumococcus-containing autophagic vesicles*), se procedió a evaluar su localización en estas estructuras en nuestro modelo de coinfección. Mediante microscopía confocal, se pudo comprobar que una subpoblación de *S. pneumoniae* intracelular se localiza en vesículas LC3 positivas en células A549 (Figura 31A-B), al igual que lo ya informado en otras líneas celulares (Ogawa et al. 2018; Surve et al. 2018). Adicionalmente, se cuantificó el porcentaje de neumococos intracelulares que se asocian a estas vesículas, tanto en células infectadas previamente con IAV y en células sin previa infección. Se pudo comprobar que la infección previa con IAV produce un aumento significativo del número de neumococos intracelulares que se hallan en vesículas LC3 positivas (Figura 31C). Estos datos, en conjunto con la evidencia de que en células infectadas con IAV hay un porcentaje disminuido de bacterias localizadas en vesículas ácidas (Figura 17), sugieren que el

bloqueo del flujo autofágico producido por el virus, favorece la supervivencia neumocócica en células epiteliales.

Figura 31. Células A549 previamente infectadas con IAV presentan un porcentaje aumentado de *S. pneumoniae* colocalizando con vesículas LC3 positivas. **A)** Imagen representativa obtenida en microscopio confocal que muestra la colocalización de *S. pneumoniae* (*Spn*), marcado con DAPI, con vesícula LC3 positiva, a 3 h post-infección (hpi), en células A549 que expresan LC3-RFP. Las células infectadas previamente con IAV y células control, fueron infectadas con *Spn*. El evento mostrado corresponde al plano Z n° 11 (de 29 planos totales). La barra de escala corresponde a 5 μm . **B)** El perfil de trazado multicanal corresponde a la línea amarilla en el recuadro del *merge* de los dos colores, y denota las intensidades de fluorescencia (expresadas en unidades arbitrarias, u.a.) de LC3-RFP (rojo) y de *Spn*-teñido con DAPI (azul). **C)** Cuantificación las bacterias intracelulares que colocalizan con LC3 en células control y células infectadas con IAV, a 3 hpi. La barra blanca corresponde a células sin previa infección con IAV (control) y la barra a verde a células infectadas con IAV. El $n \geq 100$ bacterias intracelulares por coverslip. Los valores representan la media \pm SEM de tres réplicas. El test estadístico utilizado fue *el Student's t-test* (* $p < 0,05$).



Teniendo en cuenta estos resultados, con el objetivo de confirmar el posible rol funcional que la autofagia cumpliría en este mecanismo sinérgico, se decidió realizar ensayos de infección y coinfección en células MEF *wt* y MEF *atg5-KO*. El gen *atg5* codifica para la proteína ATG5, la cual es

esencial para el desarrollo de la autofagia canónica. Por ende, las células MEF *atg5*^{-/-} son incapaces de inducir la macroautofagia convencional (Kuma et al. 2004; Nishida et al. 2009). En este contexto, tanto las células MEF *wt* (proficientes para desarrollar autofagia) como células MEF *atg5*^{-/-} (deficientes en autofagia) se infectaron con la cepa *wt* de neumococo. Al igual que lo publicado por otros autores, la sobrevivencia de neumococo se vio incrementada en un contexto deficiente en autofagia, lo que confirma el importante rol que está ejerciendo esta vía en su estadio intracelular (Figura 32).

Cuando las células MEF *wt* se infectaron previamente con IAV, se pudo observar el mismo fenotipo encontrado en células A549 (Figura 32A). En contraste a esto, en las células MEF *atg5*^{-/-} el porcentaje de sobrevivencia de la bacteria no se veía incrementado e incluso fue menor en células coinfectadas con respecto a células sin infección previa con el virus. Esto evidencia que la autofagia participa en el mecanismo por el cual IAV ejerce su efecto protector sobre neumococo (Figura 32B).

La mutante $\Delta visR$ mostró una menor supervivencia intracelular en células MEF *atg5-KO* en comparación a la observada en células MEF *wt*. Lo interesante es que esta mutante permaneció inalterable tanto en MEF *wt* como en MEF *atg5-KO* previamente infectadas por IAV (Figura 32A-B), evidenciando el mismo fenotipo observado en las células A549. En conjunto, estos resultados sugieren que VisRH cumple un rol esencial en la adaptación de la bacteria a los cambios ejercidos por IAV. El bloqueo del proceso autofágico producido por IAV podría estar evitando la fusión de vesículas autofágicas que contengan a neumococo (PCaV) con los lisosomas, por lo que favorece que no sea eliminado por este proceso efector del sistema inmune innato. Sin embargo, el entorno ácido de las PCaV requiere que la bacteria se deba adaptar, y para ello requiere de la vía de señalización VisRH.

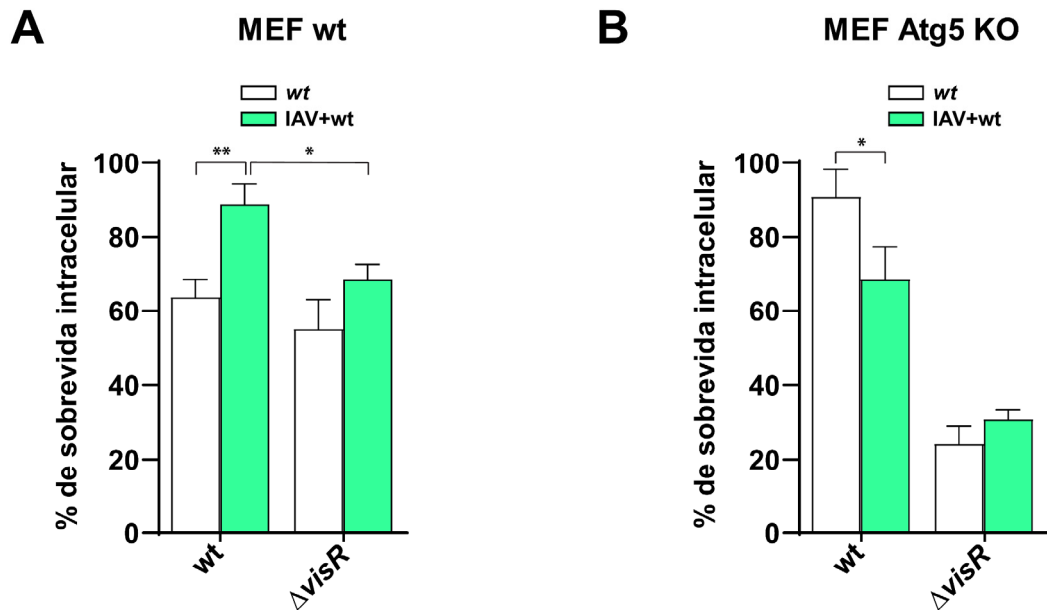


Figura 32. La sinergia viral-bacteriana depende de células proficientes en autofagia. Las células MEF (A) y MEF atg5-KO (B) infectadas con IAV y sin infectar fueron enfrentadas con las cepas wt y Δ visR durante 4 h, y se evaluó la supervivencia intracelular bacteriana como se describió previamente. Las barras blancas indican infección bacteriana y las barras verdes indican superinfección. Los valores representan la media \pm DE de un experimento representativo de 3 ensayos independientes. El test estadístico usado fue *Anova* de una vía, seguido de Test Post Hoc Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

La proteína viral M2 juega un papel clave en esta interacción

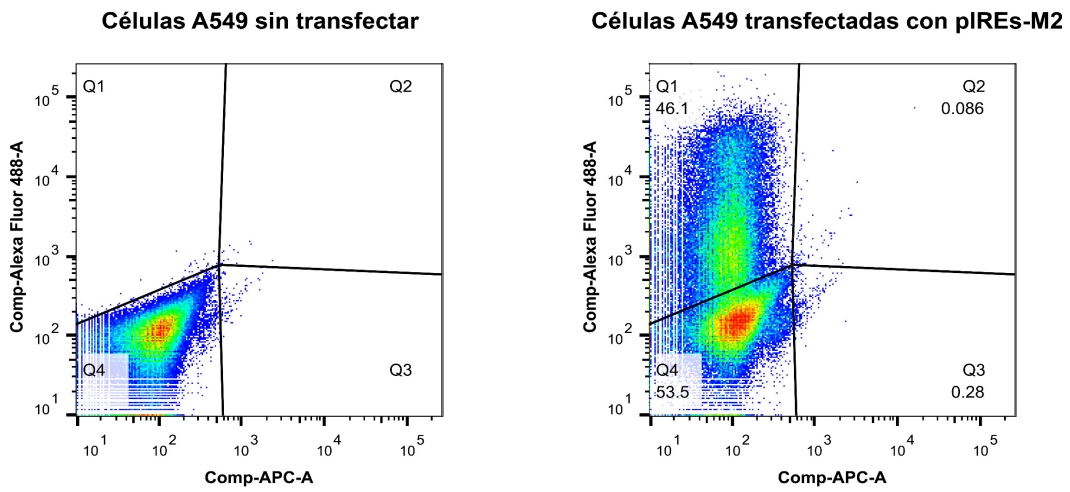
Como ya se ha mencionado previamente, la interrupción del proceso autofágico es un mecanismo muy bien descrito que IAV utiliza para su propio beneficio. Varios efectores virales contribuyen a lograr este efecto, sin embargo, una proteína en particular ha sido fuertemente asociada con la inhibición de la última etapa de la autofagia. El canal de protones M2, de vital importancia para el desarrollo del ciclo de IAV, parece ser la encargada de inhibir la fusión entre autofagosomas y lisosomas (Gannage et al. 2009; Ren et al. 2016). Debido a que el bloqueo de esta vía ocurre con la sola expresión de esta proteína en células epiteliales, nos planteamos si el sólo hecho de expresar M2 en las células A549 resultaría en cambios en la sobrevivencia de neumococo.

Para llevar a cabo esto, el gen que codifica para la proteína M2 de IAV se clonó en el vector de expresión pIRES. Este plásmido alberga, a continuación del sitio de clonado múltiple (MCS), un sitio de entrada interno al ribosoma (IRES) seguido de una GFP. Este diseño permite la expresión de dos

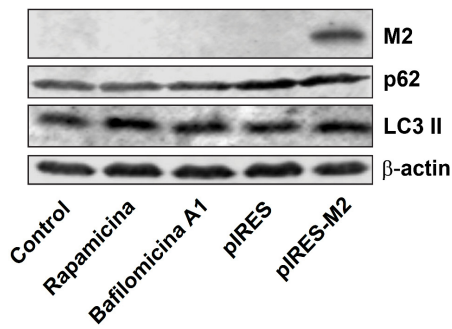
proteínas independientes a partir de un mismo transcripto, posibilitando que la expresión de GFP se use como control de transfección. El plásmido pIRES-M2 y el vector pIRES vacío (utilizado como control negativo) se transfectaron en células A549, y las células transfectadas que expresaban GFP se seleccionaron mediante citometría de flujo obteniendo una eficiencia de transfección de alrededor del 46% (Figura 33A).

La expresión de M2 se determinó mediante Western Blot, usando un anticuerpo anti-M2 y, como control de carga de proteína, se cuantificó el nivel de β -actina usando un anticuerpo específico. En las células A549 transfectadas con pIRES-M2, se detectó por SDS-PAGE una banda de 11 kDa que corresponde a la proteína viral M2, la cual no fue detectada en las células A549 transfectadas con el vector pIRES vacío (Figura 33B). Se analizaron los niveles de LC3-II y p62 mediante ensayos de Western blot y se observó un leve aumento en la expresión de estas proteínas en las células que expresan M2 en comparación a las células transfectadas con pIRES. Esto indica una inducción de autofagia por el incremento de LC3-II, pero también un bloqueo del flujo autofágico por el incremento de p62, como ya ha sido descrito anteriormente (Gannage et al. 2009) (Figura 33B-C). Cuando las células A549 que expresan M2 se infectaron con la cepa bacteriana *wt*, encontramos una mayor supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* similar a la observada con las células infectadas con IAV, mientras que las células transfectadas con el vector pIRES vacío mostraron una tasa de supervivencia bacteriana similar a la obtenida con neumocitos no infectados con IAV (Figura 33D). También se evaluó la contribución de M2 a esta sinergia utilizando amantadina, uno de los bloqueadores de canales M2 mejor estudiados (Hay et al. 1985; Jing et al. 2008) que se usa comúnmente como agente antiviral para el tratamiento de la gripe pandémica y estacional (Smith and Gums 2010). Después de 24 h de infección por IAV, se trataron estas células con 50 μ M amantadina durante la infección bacteriana. Este bloqueador de M2 no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia intracelular de *S. pneumoniae*, pero inhibió el efecto ejercido por IAV, mostrando el mismo nivel de supervivencia bacteriana que las células no infectadas por virus (Figura 33D). Estos hallazgos indicaron que el bloqueo de la fusión de autofagosoma/lisosoma causado por la expresión de la proteína viral M2 es suficiente para aumentar la supervivencia neumocócica en los neumocitos.

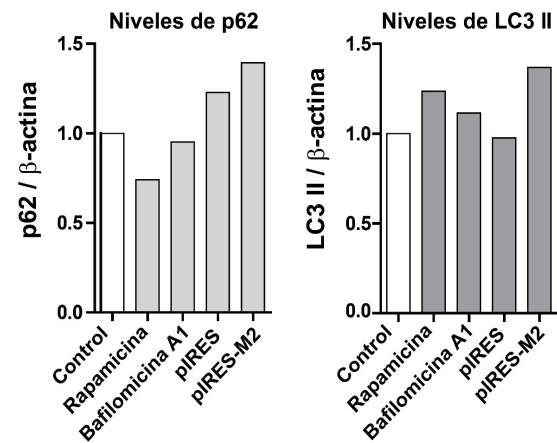
A



B



C



D

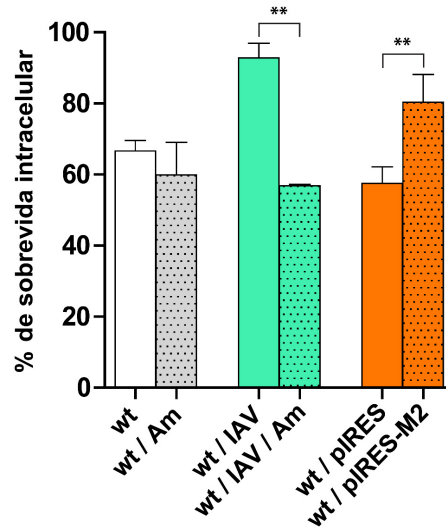


Figura 33. La expresión de la proteína M2 de IAVes suficiente para inducir una mayor sobrevivencia intracelular de neumococo. A) Análisis de flujo de la transfección pIRES-GFP-M2. de células no transfectadas y transfectadas con pIRES-M2, que expresa GFP a partir de la misma transcripción, pero de manera independiente de la proteína viral M2. La fluorescencia verde se midió en el canal FICT-A. Los cuadrantes se establecieron para permitir la cuantificación de las células no transfectadas (Q4; abajo a la izquierda) y las células de fluorescencia verde (Q1; arriba a la izquierda). El porcentaje de transfección se indica en el cuadrante Q1. En el eje y están graficados los niveles de intensidad de fluorescencia detectados del fluoróforo (Alexa 488, que posee espectros de absorción y emisión muy similares a la proteína GFP, mientras que en el eje x, se representan los valores de intensidad de fluorescencia del fluoróforo APC.**B)** La expresión de M2 aumenta los niveles de LC3-II y p62. Los niveles proteicos de las proteínas de interés fueron medidos por densitometría de las bandas reveladas por Western Blot llevados a cabo con los anticuerpos anti-LC3A/B y anti-p62. La detección de la proteína viral M2 se llevó a cabo mediante el anticuerpo anti-M2. Anticuerpo anti- β -actina fue usado para la detección de β -actina. **C)** Cuantificación densitométrica de los niveles de LC3-II y p62 mostrados en B. La actina fue usada como control de carga y para normalizar las intensidades relativas de LC3-II y p62. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes. **D)** El bloqueo de M2 mediado por amantadina durante la infección neumocócica perjudicó el mecanismo de sinergia. Las células A549 infectadas y no infectadas con IAV se infectaron con *S. pneumoniae* wt, se trataron con 50 μ M de amantadina al mismo tiempo, y se evaluó la supervivencia bacteriana como se describió anteriormente. Las barras blancas indican células no infectadas y las barras verdes indican células infectadas con IAV, mientras que las barras lisas y las barras punteadas indican células no tratadas y tratadas con amantadina respectivamente. **D)** La sola expresión de la proteína IAV-M2 reprodujo el fenotipo observado en las células infectadas con IAV. Las células A549 se transfectaron con plásmido pIRES2-EGFP como control o con pIRES2 que expresa IAV-M2, y se evaluó la supervivencia bacteriana. La barra naranja lisa y la barra naranja punteada indican células transfectadas con pIRES y células transfectadas con pIRES-IAV-M2, respectivamente. Las barras representan la media \pm DE de un experimento representativo de 3 ensayos independientes. El test estadístico utilizado fue *Anova de una vía*, seguido por *Test Post Hoc Tukey*. $p < 0,01$ (**).

Discusión Parte 2

La neumonía bacteriana causada por *S. pneumoniae* en pacientes infectados con influenza A ha tenido una relevancia significativa en la salud humana, principalmente durante las pandemias de influenza, desde la gripe española en 1918 que causó más de 50 millones de muertes en todo el mundo (Nelson and Worobey 2018), hasta la gripe porcina en 2009 que causó la muerte de aproximadamente 285,000 personas (Dawood et al. 2012). Se ha informado que un alto porcentaje de estas infecciones bacterianas secundarias son responsables de la letalidad asociada a las pandemias. Se sabe que hay factores bacterianos, virales y del hospedador que contribuyen a esta sinergia IAV-bacteria, aunque el mecanismo preciso sigue sin estar del todo dilucidado. Es importante volver a señalar que *S. pneumoniae* es un colonizante común de la nasofaringe humana. Además, este patógeno es un agente causal frecuente de otitis, sinusitis e infecciones invasivas como neumonía, bacteriemia y meningitis.

Uno de los principales nichos en los que tiene lugar la interacción entre IAV y *S. pneumoniae* es el epitelio respiratorio, donde las infecciones virales producen cambios físicos y fisiológicos que favorecen tanto la colonización como las infecciones bacterianas. En este sentido, un trabajo publicado recientemente describe los cambios globales generados por el virus, principalmente aquellos relacionados con el sistema inmune, en el tracto respiratorio superior humano, que benefician la colonización por parte de neumococo (Jochems et al. 2018). El virus es capaz de orquestar una serie de cambios que involucran diversas vías, como la vía de los interferones tipo I y II, estimulación de la vía de los TLR-4, cambios en la composición de las mucinas, entre otras, que conducen a una alteración tanto del perfil de citoquinas como de la funcionalidad de las células inmunes innatas. En individuos enfrentados al virus, se observa una menor capacidad opsofagocítica de los neutrófilos de la mucosa respiratoria, así como también un menor reclutamiento de monocitos circulantes. Además, se describió una correlación directa entre el aumento de la expresión de la quimiocina CXCL10 y una mayor carga bacteriana (Jochems et al. 2018).

Con respecto a la barrera epitelial respiratoria, donde *S. pneumoniae* coloniza o infecta como un patógeno extracelular típico, hemos informado que dicha bacteria también es capaz de sobrevivir a nivel intracelular en un modelo de infección por neumocitos. En este sentido, dos trabajos independientes, usando distintos tipos celulares, pudieron describir los destinos intracelulares de esta bacteria, en donde vesículas autofágicas específicas juegan un rol muy importante en su eliminación (Surve et al. 2018; Ogawa et al. 2018). En este trabajo, la atención estuvo centrada en analizar el impacto de la infección con IAV en la sobrevivencia intracelular de neumococo. En nuestro

modelo experimental se pudo observar que la capacidad neumocócica de supervivencia mejora claramente cuando invade los neumocitos infectados con IAV.

Además de StkP/ComE y CiaRH, se ha demostrado que otros sistemas de transducción de señales, en particular los TCS, se encuentran involucrados en mecanismos de supervivencia intracelular bacteriana en células eucariotas, como EvgSA en *Shigella flexneri* (Pasqua et al. 2019), ArcAB (Pardo-Este et al. 2019), PhoPQ (Bourret et al. 2017) y EnvZ/OmpR (Kenney 2019) en *Salmonella*, PhoPQ (Barchiesi et al. 2012) en *Serratia marcescens*, SrrAB (James et al. 2019) y GraSR (Flannagan et al. 2018) en *Staphylococcus aureus*, PhoPQ en *Escherichia coli* (Zhuge et al. 2018), BvrSR en *Brucella abortus* (Altamirano-Silva et al. 2018) y PrrAB en *Mycobacterium tuberculosis* (Mishra et al. 2017), entre otros. La mayoría de los TCS de neumococo han sido relacionados con la virulencia de este patógeno en modelos experimentales animales (Gomez-Mejia, Gamez, and Hammerschmidt 2018; Paterson, Blue, and Mitchell 2006). En particular, el TCS01, aquí renombrado como VisRH, es uno de los sistemas de transducción de señales menos estudiado en *S. pneumoniae*. El RR de esta vía pertenece a la familia más abundante de RR en neumococo, llamada OmpR. La mayoría de sus representantes se ha vinculado con alguna función y siete de ellos con algún rol en la virulencia de esta bacteria. En este sentido, el TCS01 ha sido relacionado con virulencia tanto en modelos de ratones como en un modelo de endocarditis en conejos (Hava and Camilli 2002; Throup et al. 2000; Trihn et al. 2013). Sin embargo, todavía no ha sido asociado con ninguna función fisiológica de la bacteria. Asimismo, la capacidad para sobrevivir a nivel intracelular en cultivos celulares de las mutantes de este TCS no se había estudiado hasta el momento. En este trabajo se presentan evidencias experimentales de que tanto la mutante $\Delta visR$ como $\Delta visH$ no mostraron una disminución de la supervivencia intracelular en comparación con la cepa *wt* en los neumocitos A549, lo que sugiere que probablemente ésta no fue la causa de una virulencia deteriorada en modelos animales.

Un hallazgo clave de nuestro trabajo fue que VisR, así como ClpL y PsaB, están involucrados en la respuesta al estrés inducida por *S. pneumoniae* y son necesarios para el aumento de la capacidad de supervivencia neumocócica en las células infectadas con IAV.

ClpL es un miembro de la “familia de proteínas de shock térmico” (HSP100), o también llamada familia de proteasas caseinolíticas (Clp). La familia de Clp pertenece a la superfamilia de ATPasa AAA+ y son muy importantes para el mantenimiento de la homeostasis proteica. Las mismas pueden actuar como chaperonas, o también formar complejos que median la proteólisis de proteínas dañadas, reduciendo así la proporción de proteínas desnaturalizadas de una manera dependiente de ATP. Las proteínas Clp generalmente funcionan como un complejo de subunidades catalíticas y reguladoras. Homólogos de ClpL se encuentran en muchos patógenos gram-positivos como

Staphylococcus aureus, *Lysteria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, sin embargo, no se hallan en ninguna bacteria gram-negativa (Park et al. 2015). A diferencia de otras chaperonas, ClpL no necesita de proteínas auxiliares, llamadas co-chaperonas, para ejercer su actividad (Park et al. 2015). En neumococo esta proteína es una de las principales chaperonas que se inducen a temperaturas altas (45°C) (Choi et al. 1999). Adicionalmente, se demostró que la mutante $\Delta clpL$ es sensible a 43°C, pero su virulencia no se atenúa en un modelo intraperitoneal murino (Kwon et al. 2003). Por otro lado, se ha descrito también que esta chaperona reduce la adherencia de neumococo a células A549, probablemente al modular la formación de filopodios en la célula eucariota (Nguyen et al. 2014). Además, se ha observado que mutantes de este gen son más susceptibles a la acción fagocítica de los macrófagos y poseen menor viabilidad en estadios prolongados en infecciones murinas (Tu le et al. 2007). En nuestro laboratorio, observamos que ClpL es la principal proteína que se induce a pH 5,9 en la cepa wt y que la mutante $\Delta clpL$ no es capaz de tolerar un pH ácido de 4,8 en medios de cultivo bacteriano. Se informó un fenotipo similar para *Streptococcus mutans* donde ClpL también se induce a pH 5,0 y es esencial para la respuesta de tolerancia al ácido (Len, Harty, and Jacques 2004). Además, en el presente trabajo, la mutante $\Delta clpL$ mostró mayor susceptibilidad al H₂O₂, lo que indica que ClpL no es sólo una proteína de *shock* térmico sino también una chaperona involucrada en el estrés ácido y oxidativo. Por este motivo, se propone que ClpL es una chaperona clave relacionada con la respuesta al estrés general de *S. pneumoniae*.

Por otra parte, el gen *psaB* es un constituyente del operón *psaBCA*. Las proteínas codificadas por estos genes forman parte del complejo PsaBCA que funciona como un transportador de Mn²⁺ del tipo ABC. La proteína PsaB es la subunidad intracitoplasmática de esta permeasa y es una proteína de unión al ATP (Novak et al. 1998). Se ha reportado que las mutaciones individuales en los genes que constituyen el operón *psaBCA* presentaron limitaciones de crecimiento en medios de cultivo con baja concentración de Mn²⁺, y su virulencia se vio atenuada en diferentes modelos animales de infección (Marra, Lawson, et al. 2002). La expresión de este transportador se induce durante el proceso infeccioso y se ha propuesto que posee un rol en la adherencia a células epiteliales (Berry and Paton 1996; Novak et al. 1998; Orihuela et al. 2004). Además, esta permeasa PsaBCA está relacionada a la resistencia al peróxido de hidrógeno y al anión superóxido (McAllister et al. 2004). De hecho, la mutante *psaBC* es hipersensible a la exposición a estos agentes oxidantes (Johnston et al. 2004). En este trabajo, se halló el mismo fenotipo en nuestra mutante $\Delta psaB$, confirmando que esta cepa es más susceptible al peróxido de hidrógeno exógeno que la cepa wt.

En *Streptococcus mutans*, se describió una respuesta cruzada entre el estrés ácido y oxidativo para una mutante del regulador SpxA, que regula la expresión génica de muchos genes relacionados al estrés oxidativo. De manera similar a la mutante $\Delta visR$ en *S. pneumoniae*, la mutación del gen *spxA* dañó la capacidad de *S. mutans* para crecer en condiciones ácidas y oxidativas (Kajfasz et al. 2010). El hecho de que las mutantes $\Delta visR$, $\Delta clpL$ y $\Delta psaB$ en *S. pneumoniae* mostraran alteraciones en la respuesta al estrés ácido y oxidativo, indicaría una estrategia común para la adaptación de este tipo de bacterias filogenéticamente cercanas al estrés general, y que involucra al menos un TCS, una chaperona y un transportador de Mn^{+2} , aunque seguramente hay otros factores en este tipo de respuesta. Anteriormente, se informó que la actividad de ClpL es dependiente de Mn^{+2} (Park et al. 2015), lo que podría explicar el fenotipo coincidente entre estas tres mutantes. Esto pone de manifiesto la relevancia de estas proteínas en la respuesta al estrés general de *S. pneumoniae*.

En este trabajo, se demostró que genes de respuesta a estrés están regulados a nivel transcripcional, directa o indirectamente, por VisR. Entre estos genes se encuentran *clpL* y *psaB*. Si bien no se conoce que señal percibe, este regulador de respuesta sería responsable de modular la respuesta al estrés ácido/oxidativo de *S. pneumoniae* para sobrevivir en condiciones ambientales particulares. Un ejemplo de ello es la adaptación a las condiciones impuestas por el virus de influenza A en células epiteliales respiratorias. Sin embargo, hay que destacar que la regulación de la transcripción de ambos genes probablemente se encuentra también bajo el control de otros reguladores. Se ha informado que la regulación de *clpL* es compleja y varía según el organismo (Tao, Chattoraj, and Biswas 2012). Por ejemplo, el represor conservado CtsR regula la expresión de *clpL* en muchos *streptococos* y *lactococos*, y estas bacterias presentan elementos de la caja CtsR en la región promotora de *clpL* (Tao, Chattoraj, and Biswas 2012). En *S. pneumoniae*, se han encontrado sitios de unión a CtsR corriente arriba en la región promotora del gen *clpL* (Chastanet et al. 2001), aunque, su regulación aún no se ha dilucidado. Teniendo en cuenta los ensayos de expresión diferencial, es claro que VisR participa en la regulación de la expresión de *clpL*, tanto a pH fisiológicos como ácidos. Sin embargo, resulta evidente que en la inducción de la expresión de ClpL a pH ácido participan otros reguladores además de VisR, como podría ser el caso de CtsR.

Otro escenario complejo ocurre para la regulación génica de *psaB*, debido a que la expresión del operón *psaBCA* es controlada por el regulador PsaR de una manera dependiente de Mn^{+2} (Kloosterman et al. 2008). Además, se informó que el RR04, que pertenece al TCS04, es necesario para la activación del locus *psaBCA* (McCluskey et al. 2004). En este sentido, se demostró que VisR también es esencial para la activación transcripcional del gen *psaB*, lo que indica la complejidad de esta regulación.

Con respecto a la supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* en neumocitos A549, está claro que, si bien la anulación de *visR* no alteró *per se* este mecanismo, VisR demostró ser un efector clave en la adaptación al microambiente generado por la infección viral. En este escenario, ClpL y PsaB también estarían ejerciendo un rol principal en el establecimiento de la cooperación IAV-neumococo. Considerando el ensayo de supervivencia *in vitro* en medios acidificados, donde las mutantes $\Delta visR$, $\Delta clpL$ y $\Delta psaB$ evidenciaron una tolerancia al pH ácido disminuida, sugerimos que en *S. pneumoniae* es necesario el desarrollo de un proceso adaptativo para sobrevivir bajo condiciones ácidas. Este mecanismo es esencial para que *S. pneumoniae* aumente su capacidad de adaptarse al pH ácido. Un entorno de estas características se puede encontrar, por ejemplo, en vesículas intracelulares como endosomas tardíos o autofagosomas (Maulucci et al. 2015; Cossart and Helenius 2014). En el contexto de nuestro modelo, la infección con IAV no disminuye directamente el pH intravesicular de los neumocitos. En cambio, obligaría a las bacterias a un mayor tiempo de exposición al pH ácido subletal que se encuentra en las vesículas, al bloquear su fusión con los lisosomas (Gannage et al. 2009). Ésta podría ser la explicación de por qué ninguna de las mutantes, con capacidad adaptativa disminuida, incrementó su supervivencia durante la coinfección con IAV en células A549, en contraste con la cepa *wt*.

En relación a la posible contribución del estrés oxidativo en el mecanismo sinérgico entre IAV y *S. pneumoniae*, se sabe que la infección por IAV aumenta la producción de ROS en las células A549 (Pyo et al. 2014). Además, *S. pneumoniae* induce una respuesta contra el estrés para sobrevivir en condiciones oxidativas (Gennaris and Collet 2013). Como ya ha sido mencionado anteriormente, la expresión de varios genes relacionados a la respuesta contra el estrés oxidativo se encuentra bajo el control de VisR. En particular nos centramos en el gen *psaB*, que como ya se especificó, codifica para una subunidad del transportador de Mn^{+2} . El manganeso, es un catión divalente esencial tanto para el correcto desarrollo de diversos procesos fisiológicos como para la virulencia de *S. pneumoniae* (Martin et al. 2017; Ogunniyi et al. 2010). Por ello, el mantenimiento de la homeostasis del Mn^{+2} es crítico para la viabilidad y crecimiento de este patógeno. Por ejemplo, se describió que la mutante $\Delta psaB$ es muy sensible al peróxido de hidrógeno, y que la actividad de SodA es dependiente de los niveles de manganeso. Por esta razón, este transportador está implicado en la respuesta al estrés oxidativo en *S. pneumoniae* (Eijkelkamp et al. 2014; McAllister et al. 2004). En vista de nuestros resultados, VisR controla, directa o indirectamente, la transcripción de *psaB*, lo que afecta la tolerancia al estrés oxidativo aparentemente respaldada por SodA. Para confirmar esta hipótesis, se probó la mutante $\Delta sodA$, la cual evidenció el mismo fenotipo que las mutantes $\Delta visR$ y $\Delta psaB$, que mostraron una mayor susceptibilidad al peróxido de hidrógeno en ensayos *in vitro*. Curiosamente, la

mutante $\Delta clpL$ también mostró una tolerancia alterada al peróxido de hidrógeno, lo que sugiere que ClpL es esencial para la respuesta general al estrés. Con respecto a una supuesta relación entre estas proteínas, es importante volver a resaltar que ClpL es una chaperona dependiente de Mn^{+2} (Park et al. 2015), en consecuencia, existe una relación con el transportador PsaB. Probablemente, en la mutante $\Delta psaB$, la tolerancia disminuida al pH ácido corresponda a una actividad disminuida de ClpL, debido a un nivel bajo de Mn^{+2} .

La importancia de la respuesta al estrés oxidativo en el mecanismo de supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* quedó demostrada cuando la producción de ROS fue inhibida en las células A549 por un tratamiento con NAC durante la infección bacteriana. En estas condiciones, observamos claramente que la cepa *wt* aumentó su sobrevivencia, como se describe para las células A549 (Li et al. 2015), lo que indica que *S. pneumoniae* debe superar este tipo de estrés para sobrevivir intracelularmente y que este patógeno es susceptible a los cambios en los niveles de ROS. Como ya se mencionó, la infección con IAV, al igual que muchos otros virus, resulta en un aumento de los niveles celulares de ROS. Se ha descrito que IAV necesita de un ambiente oxidativo para favorecer su replicación (Jung, Pyo, and Choi 2018). Para lograr adaptarse, *S. pneumoniae* debería ser capaz de superar tanto el estrés ácido como el estrés oxidativo.

Los resultados de este trabajo indican que la falta de PsaB perjudica la supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* probablemente por una menor disponibilidad del Mn^{+2} , necesario para muchos procesos bacterianos (Ogunniyi et al. 2010; Turner et al. 2017). Por el contrario, la mutación de los genes *visR* y *clpL* no afecta en ninguna medida el estadio intracelular en los neumocitos. Sin embargo, se observó que todos estos genes eran necesarios para el aumento de la supervivencia de *S. pneumoniae* en células A549 infectadas con IAV. Se propone que este patógeno bacteriano necesita inducir un proceso adaptativo controlado por VisR durante la coinfección. Mediante este mecanismo, se induce la expresión de chaperonas, como ClpL, cuya función es replegar proteínas desnaturalizadas por el estrés ácido y por la producción de ROS inducida por IAV. También aumenta la expresión del transportador PsaBCA, el cual proporciona el catión manganeso que es esencial para la actividad de dicha chaperona y para diversas proteínas involucradas en otros procesos celulares (Figura 34).

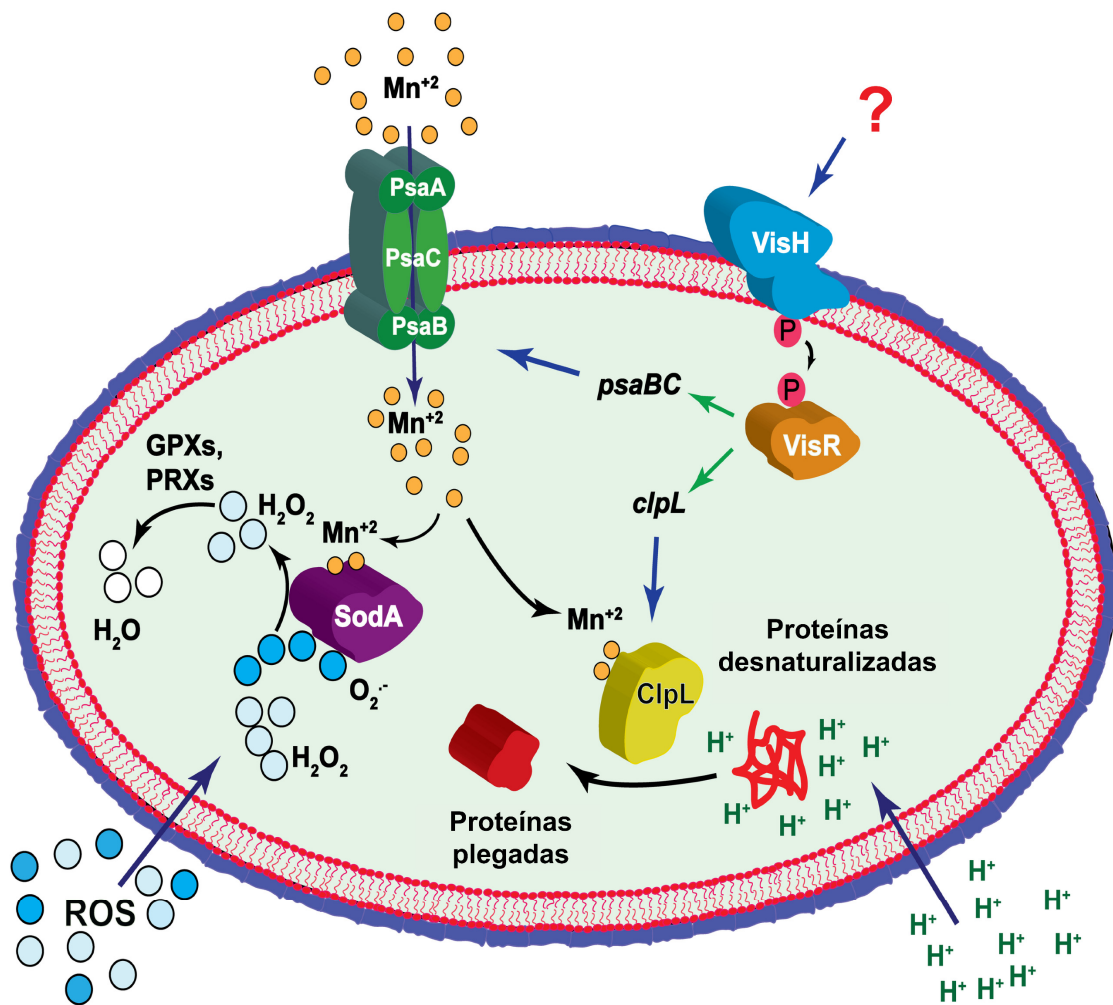


Figura 34. Modelo propuesto de la adaptación de neumococo al estrés oxidativo y ácido mediado por VisRH. El TCS VisRH participa en la regulación de varios genes involucrados en la respuesta al estrés. Sin embargo, la señal que reconoce y que conduce a la regulación de estos genes todavía no está dilucidada. La expresión de las proteínas ClpL y PsaB, se encuentra bajo la regulación de este TCS. ClpL es una chaperona cuya participación en la respuesta al estrés ácido ya ha sido documentada. VisRH junto con otros reguladores, participan en la fuerte inducción de ClpL en condiciones ácidas. La inducción de PsaB es de suma importancia para la respuesta frente al estrés oxidativo, ya que es esencial para la homeostasis del ion Mn^{2+} . El Mn^{2+} actúa como cofactor de varias proteínas, como por ejemplo SodA (que es la principal encargada en neumococo de eliminar el anión superóxido) y también de ClpL. En conjunto, estas proteínas efectoras (ClpL y PsaB) son necesarias para una adaptación adecuada de la bacteria a ambientes estresantes como el ambiente oxidativo y el ácido.

En cuanto a la participación de factores del hospedador que están involucrados en este mecanismo sinérgico, se puede nombrar a la macroautofagia. El proceso de xenofagia (macroautofagia selectiva contra patógenos) es un claro ejemplo de la respuesta celular para hacer frente a procesos infecciosos. Muchos patógenos han evolucionado, desarrollando diferentes estrategias para evadir y alterar este proceso para su propio beneficio. Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la infección por IAV produce la acumulación de autofagosomas, debido al bloqueo de la fusión entre estas vesículas y los lisosomas (Gannage et al. 2009). Por otro lado, se sabe que *S. pneumoniae* es conducido a la vía de autofagia para una posterior eliminación mediante la acción lisosomal (Ogawa et al. 2018; Ogawa et al. 2020; Surve et al. 2018). En nuestro modelo, se pudieron reproducir los resultados previamente descritos, donde hay una clara inducción de esta vía tanto en las infecciones con estos patógenos por separado como en la co-infección. Además, mediante microscopía se pudo establecer una asociación entre la mayor sobrevivencia intracelular de neumococo y el proceso de bloqueo del flujo autofágico impuesto por IAV. En células pre-infectadas con IAV, se observó una disminución de bacterias colocalizando con vesículas acídicas y un aumento de vesículas LC3⁺ que contienen a neumococo. Estas observaciones se confirmaron al utilizar células MEF proficientes y deficientes en autofagia. Asimismo, se pudo comprobar el rol de VisR, ya que la mutante $\Delta visR$ tiene un comportamiento en células MEF *wt* idéntico al mostrado en las células A549. La proteína viral que cumple un rol clave en el desarrollo de este fenotipo es la proteína de la matriz M2. Sin embargo, el mecanismo exacto mediante el cual ejerce su efecto bloqueante del flujo autofágico no está completamente dilucidado. El primer trabajo que describió la participación de M2 en este bloqueo indicó que esta proteína alteraba este proceso mediante la interacción con el complejo Beclin1-UVRAG-VPS34, el cual participa en la fusión autofagosoma-lisosoma, y que su actividad como canal de protones no cumplía ningún rol (Gannage et al. 2009). Contrariamente, un estudio posterior le otorgó un rol clave a este canal para el desarrollo de este fenotipo (Ren et al. 2016). Considerando estos trabajos previos, cuando en nuestro modelo de coinfección se agregó el bloqueador del canal de protones de M2 (Amantadina) (Hay et al. 1985; Jing et al. 2008) luego de 24 h de infección viral e inmediatamente después de la infección bacteriana, el fenotipo sinérgico de sobrevivencia se pierde. Para confirmar el supuesto rol de M2, esta proteína fue expresada en células A549, donde se evidenciaron los mismos cambios producidos por la infección de IAV, tanto en el proceso autofágico como en la sobrevivencia intracelular de neumococo. En base a estos hallazgos, se planteó un modelo mecanístico en el que la sinergia que IAV ejerce sobre *S. pneumoniae* depende del proceso autofágico y que la acumulación de autofagosomas inducida por M2 en la infección viral podría favorecer la supervivencia neumocócica en estas vesículas (Figura 35).

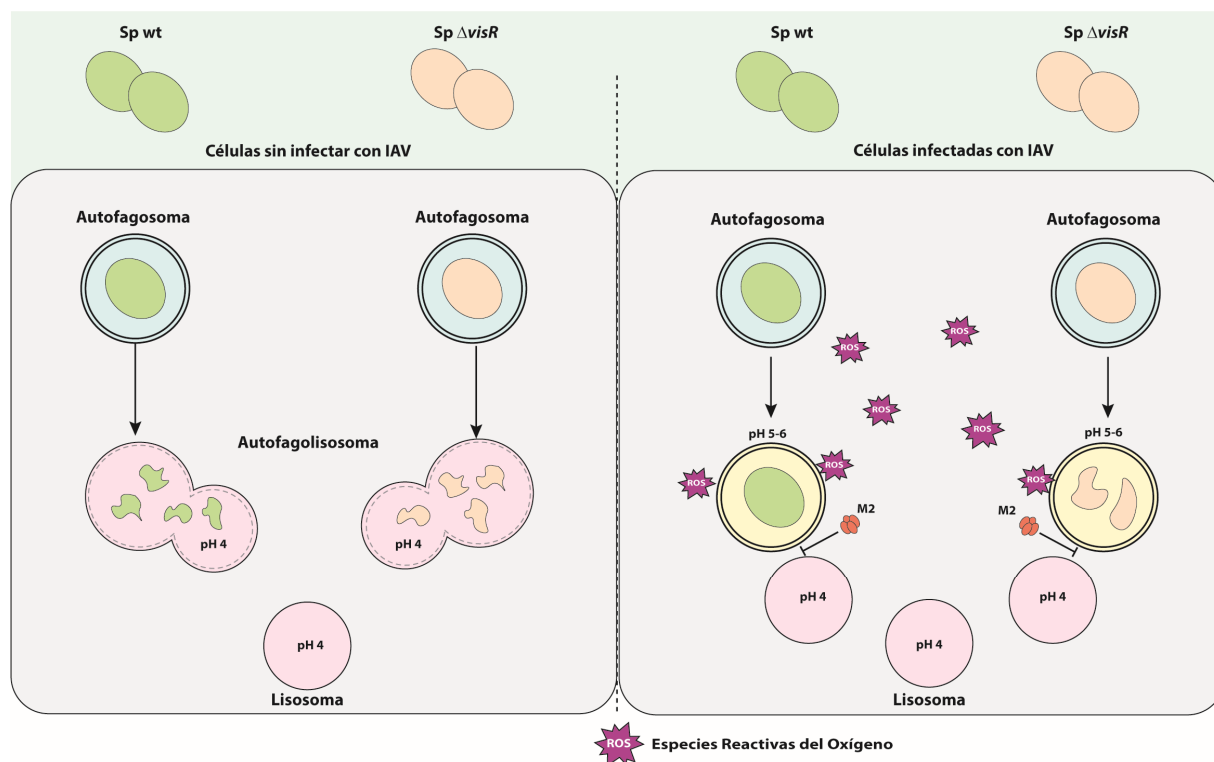


Figura 35. Modelo propuesto de como IAV favorece la supervivencia de *Spn*. Cuando las células epiteliales están infectadas con IAV, la proteína M2 del virus produce el bloqueo del flujo autofágico. Este bloqueo impuesto por el virus, disminuye la probabilidad de que neumococo sea dirigido hacia vesículas lisosomales, pero esto conlleva a que la bacteria quede alojada por más tiempo en vesículas autofágicas, las cuales poseen un pH ácido subletal. Al mismo tiempo, la previa infección con IAV genera un estallido de estrés oxidativo en la célula hospedadora. Para contrarrestar estas noxas, neumococo necesita adaptarse al ambiente ácido de las vesículas autofágicas y al estrés oxidativo para poder sobrevivir. Esta adaptación es dependiente del TCS VisRH, donde participan proteínas de respuesta a estrés como ClpL y PsaB.

La patogénesis neumocócica se ha estudiado ampliamente en las últimas décadas. Aunque *S. pneumoniae* se considera un patógeno extracelular típico, se ha prestado especial atención al mecanismo de supervivencia intracelular en los últimos años (Ercoli et al. 2018; Ogawa et al. 2018; Surve et al. 2018). Como se mencionó, las vías de señalización de CiaRH y StkP/ComE están involucradas en la respuesta al estrés neumocócico, que es esencial para su supervivencia dentro de los macrófagos y los neumocitos (Cortes et al. 2015; Pinas et al. 2018). En este sentido, se ha descrito (Ercoli et al. 2018) la replicación intracelular de *S. pneumoniae* en macrófagos esplénicos, que este patógeno utiliza como reservorio para luego diseminarse y producir sepsis. Otros investigadores demostraron que *S. pneumoniae* está atrapado en vesículas autofágicas específicas (Ogawa et al. 2018; Surve et al. 2018; Ogawa et al. 2020). En este trabajo, informamos por primera vez que la supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* aumenta en las células infectadas con IAV, y esta sinergia

ocurre en células proficientes para la vía autofágica. Para esta supervivencia, neumococo necesita una adaptación fisiológica a las condiciones inducidas por IAV. Proponemos que el TCS VisRH es una de las vías encargadas de regular diversos procesos de respuesta frente al estrés, los cuáles serían necesarios para la adaptación al ambiente impuesto por IAV dentro de las células epiteliales. VisRH controla la expresión de ClpL y PsaB, que son necesarios para tolerar el pH ácido que se encuentra en las vesículas intracelulares, así como el aumento del nivel de ROS producido por IAV.

Los resultados expuestos en este trabajo contribuyen al conocimiento del mecanismo molecular de supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* en el contexto de células eucariotas infectadas con influenzaA, y remarcan la relevancia de los tratamientos de infecciones secundarias en pacientes infectados con influenza A.

Conclusión Final y Perspectivas

Conclusión Final y Perspectivas

El presente trabajo ha estado enfocado en adquirir nuevos conocimientos acerca de la contribución de los sistemas de transducción de señales a la adaptación de neumococo a situaciones de estrés, con el fin de entender mejor cómo esta bacteria patógena es capaz de regular los diversos procesos fisiológicos que le otorgan la habilidad de adaptarse a los distintos nichos en los que se puede encontrar durante la infección natural. En particular, el principal objetivo de esta tesis fue determinar el rol de los TCS en la adaptación y supervivencia intracelular de *S. pneumoniae* en células epiteliales de pulmón.

En la primera parte de este trabajo se describieron algunos procesos fisiológicos regulados por una vía de señalización, previamente descrita en el laboratorio, la cual está compuesta por StkP y ComE. En este sistema, a pH ácidos, ComE es fosforilada por StkP y no por ComD. Esta vía controla la expresión de genes involucrados en diversos procesos celulares, entre los cuales se destacan genes asociados a la homeostasis redox. Además, mientras que la activación de esta vía conduce a una lisis bacteriana aumentada y a una menor capacidad de adaptación al pH ácido, el estado no fosforilado de ComE aumenta la capacidad de sobrevivir dentro de células epiteliales. Al analizar cuál sería la contribución de la nueva vía de señalización en el mecanismo patogénico de neumococo, se podría pensar que su activación o desactivación depende del contexto al que se vea expuesta la bacteria. En entornos extracelulares, una lisis aumentada favorecería la inducción de una respuesta inflamatoria. En cambio, una mayor supervivencia intracelular le otorgaría a la bacteria una mayor posibilidad de traspasar el epitelio y establecer la infección.

Estos resultados ayudan a entender aún más los efectos pleiotrópicos que StkP ejerce en la bacteria, lo que sin duda reivindica que esta proteína sea considerada como posible blanco para el desarrollo de nuevas vacunas. Varios grupos están volcando sus esfuerzos en desarrollar vacunas independientes de las proteínas capsulares, con el objetivo de lograr una inmunidad global a todos los serotipos de neumococo. Justamente en análisis a gran escala, StkP figura como una de las moléculas neumocócicas más inmunogénicas (Giefing et al. 2008; Ramos-Sevillano, Ercoli, and Brown 2019; Croucher et al. 2017).

A partir del análisis de expresión diferencial, se puede desprender un abanico grande de posibles estudios en los cuales se pueden ahondar en profundidad el rol que cumple esta nueva vía en otros procesos celulares bacterianos. Además, para profundizar más acerca del rol de esta vía en el mecanismo de patogenicidad, se podría evaluar la virulencia de las cepas mutantes en modelos animales murinos, así como también desarrollar modelos celulares con células de la inmunidad

innata como neutrófilos o macrófagos con el fin de determinar si cumple algún rol en la resistencia contra estas células encargadas de la depuración de la bacteria.

El objetivo principal de la segunda parte de esta tesis estuvo dirigido a obtener nuevas pistas de cómo el Virus de la Influenza predispone a una superinfección por *S. pneumoniae*. Si bien varios aspectos de este mecanismo han sido caracterizados, este trabajo pone en evidencia una nueva forma mediante la cual el virus favorece la infección neumocócica secundaria. Hemos podido determinar que una infección previa con el virus conduce a un aumento de la capacidad de sobrevivir de la bacteria dentro de células epiteliales de origen pulmonar. Mecanísticamente, este fenotipo es causado por un conjunto de factores virales, celulares y bacterianos.

Por un lado, el virus produce la disrupción de diversos procesos celulares que alteran la homeostasis celular. La autofagia es una importante estrategia que usan las células para combatir agentes, entre ellos virus y bacterias. En este estudio hemos sido capaces de comprobar que el aumento de la sobrevivencia intracelular de neumococo se debe en parte al bloqueo de la vía autofágica mediado por la proteína viral M2. En este contexto la bacteria no alcanzaría vesículas degradativas como los lisosomas, sin embargo, el neumococo tiene que enfrentarse no sólo a la adaptación a condiciones acídicas, que le posibilitan sobrevivir en vesículas autofágicas, sino que también debe desplegar un mecanismo de defensa que combata el estallido de ROS que el virus genera dentro de la célula.

Por otra parte, se halló un TCS necesario para la adaptación a estas nuevas condiciones impuestas por el virus. Este TCS corresponde al poco caracterizado TCS01, que hemos renombrado como VisRH. Este TCS regula, de manera directa o indirecta, la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo y estrés ácido. Este hallazgo es de suma relevancia, ya que por primera vez se puede asociar a este TCS con un determinado rol en el mecanismo patogénico del neumococo. Estudios complementarios se pueden desprender a partir de los resultados de los experimentos de expresión comparativa, ya que, al parecer, este TCS es un regulador global de diversos procesos bacterianos. De acuerdo a los resultados de RNA-seq, VisRH regula la expresión de genes relacionados tanto a la división celular como a la síntesis de pared celular, por lo que se podría pensar que este TCS es importante en el establecimiento de algún mecanismo de resistencia contra antibióticos que actúan sobre la pared celular como los β -lactámicos o la fosfomicina. Además, este TCS regula la expresión de bacteriocinas. Comprender de qué manera puede afectar esta regulación en la competencia con las demás bacterias constituyentes de la microbiota, podría ser de vital importancia para el entendimiento del mecanismo de colonización de esta bacteria.

Es importante destacar que los TCS son blancos muy atractivos para el desarrollo de nuevos antibióticos, con nuevos mecanismos de acción, ya que estos son muy ubicuos en bacterias y presentan dominios catalíticos altamente conservados, lo que posibilitaría que una misma droga actúe sobre diversas vías al mismo tiempo.

A la luz de estos hallazgos, se podría plantear si la inducción de la autofagia podría servir como estrategia terapéutica para el tratamiento de infecciones secundarias bacterianas. Sin embargo, el uso de inductores de autofagia ha sido probado en diversos modelos animales sin demasiado éxito (Fabri et al. 2011). Por ejemplo, el empleo de rapamicina genera algunos efectos adversos, debido a los efectos pleiotrópicos de esta droga, que no sólo estimula el flujo autofágico, sino que también puede modular la función de células de inmunidad innata encargadas de la eliminación del patógeno (Fabri et al. 2011). Además, no suele haber correlación entre los resultados observados en cultivos celulares y modelos animales cuando estos fármacos son usados (Fabri et al. 2011). Por último, muchos patógenos (en particular virus y bacterias intracelulares) han evolucionado desarrollando múltiples mecanismos para evadir o incluso explotar el mecanismo autofágico para su propio beneficio. Estas observaciones ponen de manifiesto la importancia profundizar los estudios sobre el funcionamiento de esta vía, para ser considerada como un enfoque terapéutico alternativo (Fabri et al. 2011; Kimmey and Stallings 2016). Sin embargo, podría considerarse una posible sinergia entre moduladores de la autofagia y los antibióticos como una nueva estrategia para tratar infecciones, aunque es necesario conocer correctamente su potencial clínico.

Por último, este efecto protector que el virus ejerce en el interior celular sobre neumococo ha sido estudiado utilizando únicamente una cepa de influenza A H₁N₁. Un análisis extensivo a otras cepas virales, incluso a cepas de influenza aviar como IAV H₅N₁ o H₇N₉, sería una gran contribución al conocimiento del sinergismo existente entre ambos patógenos.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas, condiciones de crecimiento y transformación:

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo se listan en **Anexo Tabla 1**. Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó medio Luria-Bertani (LB) líquido o sólido suplementando con antibiótico, según se requirió. Los stocks de las diferentes cepas de *Streptococcus pneumoniae* se prepararon rutinariamente a partir de cultivos de células crecidas en medio BHI a 37 °C hasta $DO_{600nm} \approx 0,3$, a los cuales se les adicionó glicerol 20% (concentración final, v/v) y se los guardó a -80 °C. Para los ensayos de análisis de expresión diferencial de genes las cepas fueron crecidas en medio BHI a 37 °C hasta $DO_{600nm} \approx 0,3$, centrifugadas y resuspendidas en medio MD5 pH=5,9. Los ensayos para medir la producción y liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) las bacterias fueron crecidas en medio Todd-Hewitt pH=7,35 o pH=5,9 según correspondía.

*Generación de mutantes mediante mutagénesis por delección en *S. pneumoniae**

Se diseñaron mutantes empleando una estrategia de mutagénesis por delección del gen de interés. Este mecanismo consiste en la utilización de un cassette de 1,3 Kb constituido por un gen de resistencia contra la kanamicina (*kan*) y un marcador de contra selección, *rpsL*⁺. Este cassette, llamado *Janus* (Sung et al. 2001), confiere sensibilidad dominante a la estreptomina en bacterias resistentes a dicho antibiótico. Esta resistencia se genera por una mutación puntual del gen *rpsL*, produciendo una sustitución de lisina en la proteína S12 de la unidad ribosomal pequeña. Como esta mutación es recesiva, se ha empleado un alelo *rpsL*⁺ para proporcionar un fenotipo dominante sensible al fármaco en contextos genéticos donde puede proporcionar una selección directa para eventos de delección o mutación.

Debido a estas características, este cassette bi-cistrónico se puede emplear en un procedimiento de dos etapas de transformación, para generar la mutante de interés. Para tal fin, mediante pasos de amplificación por PCR, digestión de las secuencias amplificadas y posterior ligado, se puede generar una construcción que estará constituido por la región *rio arriba* de la secuencia que se quiere reemplazar, el cassette *Janus* y la región *rio abajo* de dicha secuencia. En un primer paso de transformación, mediante un evento de doble recombinación homóloga se introdujo el cassette en reemplazo de la región de interés. Este evento conduce a que una cepa originalmente estreptomina resistente (Sm^R) se convierta en kanamicina resistente (Km^R) y estreptomina sensible (Sm^S).

La cepa Km^R obtenida se somete a un segundo paso de transformación, pero esta vez se transforma con una construcción constituida solamente por las regiones colindantes de la secuencia de interés. Esta transformación induce un segundo paso de recombinación homóloga que elimina el cassette Janus, y por lo tanto se restaure el fenotipo de Km^S Sm^R. El producto final es una mutante a la cual se ha eliminado el gen de interés y no presenta ningún cassette de resistencia (Figura 36).

Cabe destacar que ya en el primer paso se ha generado una mutante que contiene el casete Janus. Esto es importante aclarar, puesto que hay genes como *stkP* y *comE*, que son esenciales para el proceso de competencia, por lo que si se deletionan en un primer paso, las cepas generadas no son capaces de transformar.

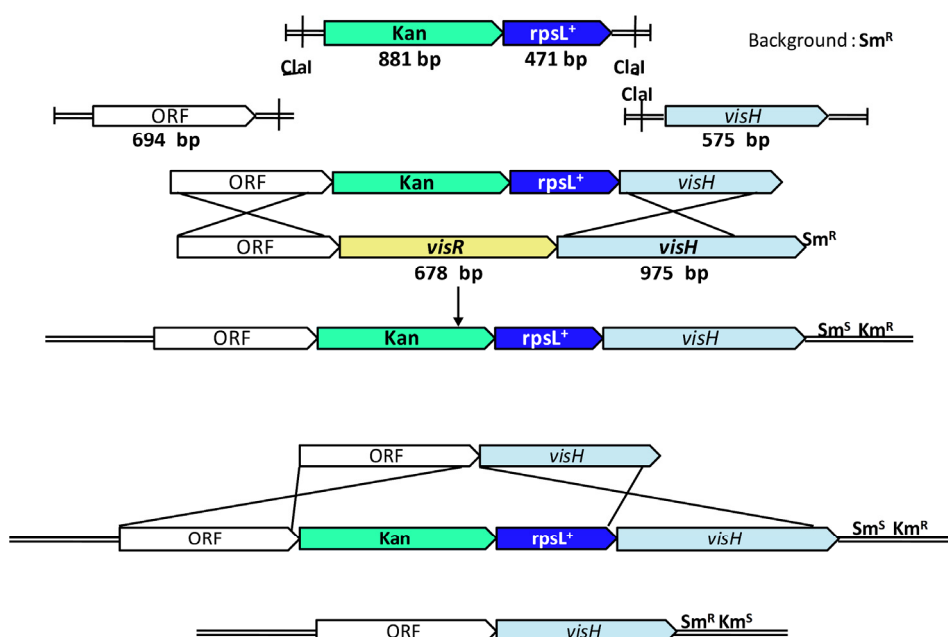


Figura 36. Esquema de mutagénesis por Janus.

Cepas virales, obtención de stocks de trabajo y titulación

La cepa viral utilizada en este trabajo fue *influenza A/PuertoRico/8/34 (H1N1)*, o PR8 (Gerber, Loosli, and Hambre 1955; Magill and Francis 1937). De manera resumida, los stocks se crecieron en huevos embrionados de pollo de 9 días, inyectando 200uL de cada dilución de la muestra viral (preparadas en PBS suplementadas con gentamicina) directamente en la cavidad amniótica. Para dicha inoculación se utilizaron 3 huevos por cada dilución viral, en los cuales, el saco de aire fue debidamente identificado y perforado para permitir la inyección directa de la preparación viral a la cavidad correspondiente. Inmediatamente los huevos fueron sellados con parafina e incubados

durante 3 días a 35 °C. Luego de dicho tiempo, los huevos fueron perforados en condiciones de esterilidad para recolectar el líquido amniótico. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 5.000 *g* y se alicuotó el sobrenadante en fracciones de 500 μ L, para guardar directamente en freezer de -80°C. Los stocks se semicuantificaron mediante la técnica de hemaglutinación.

Ensayos de hemaglutinación

Brevemente, 3 mL de sangre entera humana se lavó 5 veces con PBS. El pellet compacto de glóbulos rojos fue resuspendido en PBS para obtener una concentración de 0,5%. El stock viral se diluyó seriadamente en PBS y posteriormente, 50 μ L de la suspensión de glóbulos rojos fueron agregados individualmente a los pocillos de una placa de 96 multipocillos, con fondo-V. Luego de 45 min de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se clasificaron como HA-negativos (cuando no se observó hemaglutinación, consistente con un pellet rojo que se deslizó al colocar la placa verticalmente) y HA-positivos (se observa una delicada suspensión de glóbulos rojos).

Ensayos de Dosis Infecciosa del 50% de Cultivo Tisular (DICT₅₀ o TCID₅₀)

Para conocer el número de partículas infecciosas en un stock viral se realizó una cuantificación mediante ensayo de Dosis Infecciosa del 50% de Cultivo Tisular (DICT₅₀ o TCID₅₀, por sus siglas en inglés) usando como método de cálculo el Método Reed-Muench. Para llevar a cabo esta cuantificación se plaquearon alrededor de $1,8 \times 10^4$ células MDCK.2 por pocillo en una placa de 96 multipocillos. A las 24 horas de sembrado las células alcanzan un 100 % de confluencia (alrededor de $3,6 \times 10^4$ células). A este tiempo, las células fueron lavadas tres veces con PBS para eliminar la mayor parte de SFB y se añadió OPTI-MEM + TPCK-tripsina (1 μ g/mL). Se realizaron diluciones seriadas (en un factor de 10) de las muestras virales y se procedió a infectar las células con cada dilución. Para este método se realizaron 8 replicados por cada dilución y se diluyó cada muestra hasta 10 veces. Luego de la infección se incubaron las células en la estufa 37°C y se observaron el fenotipo celular a las 24, 48 y 72 h. El tiempo donde se observa de mejor manera el efecto citopático o citotóxico de las células fue a las 72 h. En este punto se considera cada pocillo de cada réplica positivo o negativo según si se considera que haya efecto citopático o no, observando las células un microscopio invertido de campo claro. Una vez establecida la condición de cada pocillo se procedió a la cuantificación estadística del TCID₅₀ usando como método de cálculo el Método de Reed-Muench.

Transfección de células eucariotas

La expresión de proteínas en células eucariotas se llevó a cabo mediante la transfección de vectores que albergan los genes de interés. Las transfecciones se realizaron usando el reactivo Jet-Prime®, cuyo mecanismo involucra la acción de lípidos catiónicos, y se siguieron las indicaciones del fabricante. Los plásmidos usados tenían calidad libre de endotoxinas. La relación de cantidad de plásmido por volumen de reactivo fue de 1 µg de ADN : 2 µL de reactivo.

Construcción para expresar M2 de IAV en neumocitos A549

Con el objetivo de expresar M2 del IAV en las células A549, se realizó una construcción artificial para clonar en el vector de expresión pIRES2-EGFP. M2 es una proteína viral que es codificada a partir del segmento 7 del genoma viral, mediante un mecanismo de splicing-alternativo (Figura 37). La construcción que contenía el cDNA de M2 fue llevada a cabo mediante dos pasos de PCR. La primera reacción, amplificó el fragmento de mayor tamaño del gen, usando los cebadores FintM2PR8 y RM2PR8 y como molde un plásmido que contiene el segmento 7 del genoma de la cepa PR8. El producto de esta reacción se utilizó como molde para la segunda reacción. En este caso los cebadores usados fueron FM2PR8 y RM2PR8. FM2PR8 es un mega cebador que contiene un segmento que es idéntico al cebador FintM2PR8 antecedido de un fragmento que amplifica la primera porción de M2 y de una secuencia Kozak (Figura 37). RM2PR8 posee en el mismo marco de lectura que el gen amplificado, una secuencia de FLAG seguido del sitio de restricción PstI. El producto final posee el gen completo de M2 y extremos con sitios de restricción. El paso posterior fue el clonado de este producto en el plásmido pIRES2-EGFP2, el cual permite la expresión independiente de la proteína de interés y de la proteína EGFP a partir de un mismo transcrito en las células eucariotas.

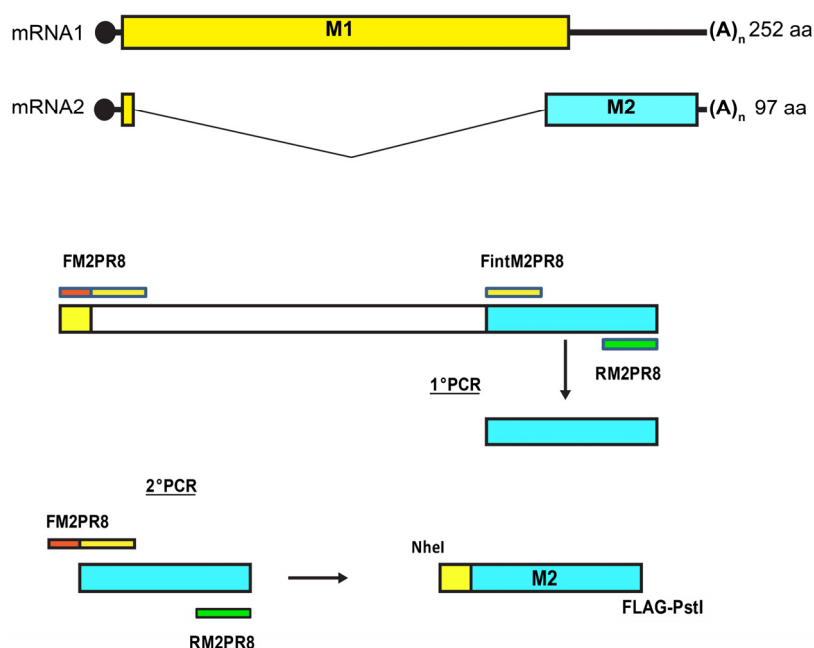


Figura 37. Construcción *in vitro* del cDNA de M2 fusionado a FLAG para ser clonado en el vector pIRES2-EGFP.

Ensayo de infección de neumocitos A549 con *S. pneumoniae*

Cuantificación de la sobrevivencia intracelular (ensayo de protección con gentamicina)

El número de bacterias intracelulares viables recuperadas luego de la endocitosis fue cuantificado mediante una adaptación del ensayo de protección de antibióticos. Brevemente, se sembraron en pocillos (12-wells plates, Greiner Bio-One, 657160) aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células de las líneas A549, HeLa, MEF *wt*, o MEF *atg5-KO*, y se incubaron por 24 h en medio DMEM suplementado con 5% de SFB. Las distintas cepas de *S. pneumoniae* fueron crecidas en medio BHI hasta DO_{600nm} 0,3 y luego se resuspendió en medio DMEM con 5% SFB. La infección de las monocapas celulares fue llevada a cabo utilizando una multiplicidad de infección (MOI) 30. El tiempo de incubación fue de 3 h. Luego de este período, las células fueron lavadas con PBS y se agregó DMEM fresco suplementado con SFB al 5% y 200 μ g/mL de sulfato de gentamicina (US Biological, #G2030), el cual al no penetrar las membranas celulares eucariotas permite obtener el recuento solamente de las bacterias internalizadas. Después de 30 min, las células fueron lavadas tres veces con PBS se tripsinizaron para posterior lisis por centrifugación a 15,000 *g* por 5 min y el pellet (bacterias intracelulares liberadas y debris de células eucariotas) se resuspendió en 500 μ L de medio BHI. Se cuantificó el número de

bacterias intracelulares sobrevivientes en diferentes tiempos, a través de diluciones seriadas y de plaqueo de 50uL sobre placas de BHI-agar suplementadas con 5% sangre de carnero. Estas últimas se incubaron por 16 h a 37 °C. A través de una puesta a punto del modelo se determinó que 30 min eran suficientes para producir la muerte de las bacterias que no fueron internalizadas. El recuento de bacterias intracelulares a este tiempo (designado como punto 0 h del experimento) se consideró como 100% de sobrevivida y las posteriores muestras obtenidas fueron referidas a ese punto para el cálculo de los respectivos porcentajes.

Cuantificación de la sobrevivida bacteriana intracelular en células A549 tratadas con Bafilomicina A1 o con N-acetil-cisteína (NAC)

Los ensayos de sobrevivida en células tratadas con Bafilomicina A1 (inhibidor farmacológico de la protón ATPasa Tipo V) fueron realizados tal como se describió anteriormente el ensayo protección con gentamicina con una modificación. Al medio fresco que se adicionó tres horas posteriores a la infección fue DMEM suplementado con SFB (5%) gentamicina (200 ug/mL) y Bafilomicina A1 (100nM).

Para los ensayos en los que se requería evaluar el rol de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en la sobrevivida intracelular de neumococo se utilizó N-acetil-cisteína (NAC). El protocolo es el mismo descrito previamente con modificaciones. En el momento de infección con la bacteria se adicionó DMEM suplementado con SFB 5% y NAC 5mM a los pocillos correspondientes. Adicionalmente el medio de recambio que contiene el antibiótico también contenía NAC 5mM.

Ensayos de coinfección con IAV y S. pneumoniae

Para conocer la sobrevivida intracelular de neumococo en células previamente infectadas con IAV, se utilizó el mismo de ensayo de protección con gentamicina explicado anteriormente con algunas modificaciones. Luego de 24 h de haber sembrado las células se procedió a la infección viral. Para ello se removió el medio conteniendo SFB y se lavó tres veces con PBS para eliminar las trazas de suero. A continuación, se añadió medio DMEM fresco libre de SFB y conteniendo TPCK-tripsina (1µg/mL). La función de esta tripsina es de suma importancia, puesto que produce la fisión de la proteína viral HA, generando la liberación del “péptido fusión” de esta proteína, que es esencial para la entrada del virus a la célula. La eliminación del suero es un paso crucial, ya que éste produce la inhibición de la

tripsina. El paso posterior consistió en la infección propiamente dicha con IAV, teniendo en cuenta la MOI elegida. El virus debe ser descongelado de manera lenta, siempre en hielo, para que no pierda la viabilidad. Además, hay que tener en cuenta que estas muestras provienen del líquido alantoideo de huevos de pollo embrionados, por lo que siempre hay que considerar que a las células no infectadas hay que añadir líquido alantoideo libre de IAV. Las células A549 y HeLa resisten la incubación de 24h con DMEM conteniendo TPCK-tripsina y el líquido alantoideo con y sin IAV. Pasadas las 24h de incubación se procedió a la infección bacteriana, tal cual se describió anteriormente.

Para la infección de células MEF, tanto *wt* como *atg5-KO*, se realizaron unas pequeñas modificaciones. Estas células son muy sensibles a la acción de la TPCK-tripsina. Por esta razón, el virus fue incubado con el doble de concentración de tripsina, es decir 2 µg/mL, a 37°C por 2h, previo a la infección de las células. Luego la infección se realizó de la misma manera que para las otras células, pero en este caso no se removió el SFB en ningún momento.

Ensayos de coinfección con tratamiento con amantadina

Para evaluar el efecto de la amantadina en células coinfectadas, se procedió exactamente de la misma manera descrita en el ensayo anterior con una sola salvedad. Al momento de enfrentar las células a la infección con neumococo, se adicionó a las células correspondientes amantadina en una concentración de 50mM.

*Ensayos in vitro de *S. pneumoniae**

Ensayos de sobrevivencia al H₂O₂

Para determinar la tolerancia de las distintas cepas de neumococo al peróxido de hidrógeno, las células fueron incubadas en medio rico como BHI (infusión cerebro-corazón) a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} 0,3. Una vez que alcanzaron dicha densidad, a cada alícuota se le añadió peróxido de hidrógeno a una concentración final de 20mM. Se realizaron recuentos de las bacterias viables a diferentes tiempos: 0, 30 y 60 min. Para tal fin, se tomaron alícuotas de cada cepa, se realizaron distintas diluciones, las cuales luego fueron sembradas en placas de agar BHI sangre al 2%. Posterior a 16h de incubación a 37°C, se procedió al recuento de las UFC. El recuento de tiempo 0 se realizó

tomando alícuotas de cada muestra instantes antes de la adición del peróxido, y dicho recuento se consideró el 100% de viabilidad celular.

Ensayos de sobrevivida al pH ácido

Para medir la sensibilidad de las diferentes cepas de neumococo al pH ácido, las bacterias se cultivaron en medio BHI a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,3. Una vez alcanzado ese punto en la curva de crecimiento, se tomaron alícuotas para realizar el recuento de las UFC en placa, el cual consideramos como el 100% de células viables. Además, se tomaron alícuotas de cada muestra, se centrifugaron a 12000g y se resuspendieron en medio MD5 pH 4,8. Las bacterias se incubaron en este medio a 37°C por 2h. Luego de ese tiempo, se extrajeron alícuotas para la realización del número de bacterias viables, mediante el recuento de UFC en placas de agar sangre como ya se ha mencionado.

Ensayos de respuesta de tolerancia al ácido (ATR)

Para realizar los clásicos ensayos de respuesta de tolerancia al estrés ácido se procedió de la siguiente manera. Al igual que los procedimientos anteriores, las bacterias se incubaron en BHI hasta alcanzar la DO_{600nm} de 0,3. En este punto, se tomaron alícuotas de cada muestra para realizar el recuento de UFC (del mismo modo ya descrito) al cual se lo llamó Recuento Tiempo 0 No inducido (T0Ni). Dos alícuotas adicionales fueron centrifugadas y resuspendidas en dos medios diferentes, una en MD6 pH 5,9 y otra en MD5 pH 4,4. Cada una es incubada a 37°C por 2h. Luego de ese tiempo, se hicieron diluciones de cada una de ella para realizar recuentos. El recuento de la alícuota a pH 4,8, se denominó Recuento Tiempo 2 No inducido (T2Ni), y su número se referenció a T0Ni, la cual se consideró como 100% de viabilidad en condiciones de no inducción, es decir la condición de enfrentarse directamente a un pH letal sin previa adaptación. Por otra parte, cuando las bacterias son enfrentadas a un pH subletal, como el pH 5,9, experimentan el proceso de adaptación al pH ácido, de allí que esta condición se denomine “inducida”. El recuento de esta alícuota luego de las 2h se denominó T0i. Además, estas bacterias se volvieron a centrifugar y fueron incubadas en medio MD5 pH 4,4 por otras 2h más. En ese tiempo, se realizó un nuevo recuento al que llamamos T2i. El porcentaje de sobrevivida de las células inducidas se calculó al relativizar el recuento de T2i con el número de UFC de T0i, considerado como el 100%.

Medición de los niveles de H₂O₂ producidos por S. pneumoniae

Para la detección de H₂O₂ liberado por las células bacterianas, se utilizó el micro ensayo de oxidación con rojo fenol. Brevemente, las células se cultivaron en BHI hasta la fase de crecimiento exponencial (DO_{600nm} 0,3). Posteriormente, las células se centrifugaron a 10.000g durante 5 minutos, se resuspendieron en caldo Todd Hewitt (pH 5,9) y se incubaron durante 1 hora a 37 ° C. Se tomaron alícuotas y se realizaron diluciones seriadas para determinar células viables mediante recuento de UFC en placas de BHI agar con sangre. Se centrifugaron otras alícuotas a 10.000g durante 5 minutos, y se transfirieron 100 µl de sobrenadantes a placas de pocillos múltiples y se mezclaron con el mismo volumen de la solución tampón PRS (NaCl 140 mM, dextrosa 5.5 mM, rojo fenol 280 µM y peroxidasa de rábano picante 8.5U/ml en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,0). Las reacciones se incubaron durante 90 minutos a 37 ° C y la reacción se detuvo con 10 µl de NaOH 1 N. Los pocillos reactivos se leyeron en un lector de microplacas (Bio-Rad) con un filtro de 595 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mili moles de H₂O₂ liberados por 10⁶ células bacterianas.

Cultivo de bacterias para análisis de expresión diferencial de genes

Para poder realizar los análisis tanto de transcriptómica comparativa y de proteómica comparativa, las bacterias fueron tratadas de la siguiente manera.

Tanto la cepa wt como las cepas mutantes a estudiar, fueron crecidas en BHI hasta DO_{600nm} 0,3. Posteriormente, se centrifugaron a 10000g y se resuspendieron en medio MD 5 pH 5,9 o MD6 pH 7. Luego de 2h de incubación a 37°C, se realizaron las extracciones de ARN y de proteínas para su posterior análisis.

Para extraer el ARN para los ensayos de RNA-seq y qRT-PCR, las muestras fueron tratadas como se indica a continuación. Una vez transcurrido el período de incubación, las muestras se centrifugaron. A los pellets de células bacterianas se les añadió de manera directa la mezcla comercial TRIzol®, la cual es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que está diseñada para aislar fracciones separadas de ARN, ADN y proteínas a partir de muestras de tejidos y células de origen humano, animal, vegetal, levadura o de origen bacteriano. Los pasos siguientes se realizaron respetando el protocolo dispuesto por el fabricante.

Para la extracción de proteínas, los pellets de bacterias fueron resuspendidos en 150ul de buffer con Tris pH=8, 10mM y EDTA 1mM, luego se agregó 10ul de solución de doxiciclina 0,5%-SDS 0,25% para romper la pared de la bacteria, y finalmente se agregó 100 µl de buffer Laemmli con β-mercapto (Todas las soluciones fueron filtradas con filtros de 0,22um).

Análisis de expresión diferencial mediante ensayos de RNA-seq

Estos estudios fueron realizados por la compañía Xcelris, ubicada en India. Para que las muestras de ARN pudieran ser enviadas, el ARN de cada muestra fue tratado con la solución comercial RNAsable®, la cual se utiliza para preservar el ARN a temperatura ambiente sin ser degradado. Una vez resuspendidas las muestras, se procedió de la siguiente manera. Se utilizó el kit de purificación de ARN bacteriano Ribopure (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante, y el ADN contaminante se eliminó utilizando DNAasas. 8 µg de ARN total fueron tratados para eliminar el ARNr, utilizando el Kit de Enriquecimiento de ARNm Bacteriano MICROBExpress (Ambion). Luego las bibliotecas de transcriptoma se prepararon con el Kit de Preparación de Biblioteca de ARN, llamado TruSeq (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ARNm enriquecido se fragmentó usando los reactivos proporcionados con el kit, y esto fue seguido por la síntesis de ADNc. Las bibliotecas se etiquetaron con índices únicos y se amplificaron durante un número limitado de ciclos de PCR seguidos de cuantificación y calificación utilizando el kit de ensayo de alta sensibilidad de ADN. Las muestras se secuenciaron usando el Illumina Hi-Seq. Las lecturas fueron recortadas por Trimmomatic^{0.36} para generar lecturas de alta calidad. Posteriormente, las lecturas de cada muestra se alinearon por separado al genoma de *Streptococcus pneumoniae* R6 usando BWA -versión 0.7.12-r1039 (bio-bwa.sourceforge.net) en los parámetros predeterminados. El paquete de software SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) se utilizó para convertir el archivo de alineación de secuencia/mapa (SAM) en un archivo de alineación/mapa binario (BAM) ordenado. La relación de lecturas asignadas (MRR) a la referencia en cada conjunto de datos se calculó aplicando el comando flagstat del software SAMtools al archivo BAM.

Análisis de Expresión diferencial

Las lecturas alineadas fueron ensambladas por Cufflinks (versión 2.2.1), y luego los genes expresados diferencialmente fueron detectados y cuantificados por Cuffdiff, incluido en el paquete de Cufflinks, utilizando un análisis estadístico sofisticado riguroso. La expresión de los genes se calculó en términos de FPKM (fragmento por kilobase por millón de lecturas mapeadas). El análisis de expresión génica diferencial se realizó entre wt y $\Delta visR$ y entre wt y *comE*^{128A}.

qRT-PCR

El ARN bacteriano purificado se trató con DNAsas para eliminar cualquier contaminación con ADN. La retro transcripción, es decir la síntesis de ADNc se realizó utilizando M-MLV RT (Moloney-Murine Leukemia Virus retro transcriptase, Promega, M1701) y hexaprimers, según las indicaciones del fabricante, partiendo de 2 µg de ARN. El ADNc se limpió usando el kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen). Los genes se amplificaron utilizando los oligonucleótidos correspondientes y PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) siguiendo el protocolo del fabricante. La expresión relativa de cada gen fue calculada usando el método de Livak y Schmittgen ($\Delta\Delta C_t$) (Livak and Schmittgen 2001). El gen que se utilizó para normalizar fue *gyrA* [83]. El *gyrA* tenía una expresión similar por RNA-Seq para wt y el mutante $\Delta visR$, y esto se había utilizado para normalizar la expresión en *S. pneumoniae* en otros estudios [84].

Proteómica Comparativa

La digestión de proteínas y el análisis de espectrometría de masas se realizaron en el Centro de Proteómica CEQUIBIEM, en la Universidad de Buenos Aires/CONICET, de la siguiente manera. Las muestras de proteínas se redujeron con ditioneitol (DTT) en 50 mM de bicarbonato de amonio a una concentración final de 10 mM (45 min, 56°C) y se alquilaron con yodoacetamida en el mismo solvente a una concentración final de 30 mM (40 min, a Temperatura ambiente, en la oscuridad). Las proteínas se digirieron con tripsina (Promega V5111). Después de eso, los péptidos se purificaron y se removieron las sales con columnas ZipTip C18 (Millipore). Los péptidos digeridos se analizaron mediante nano-LC-MS/MS en un espectrómetro de masas Q-Exactive (Thermo Scientific) acoplado a un nano-HPLC EASY-n LC1000 (Thermo Scientific). Para el análisis LC-MS/MS, se cargaron aproximadamente 1 µg de péptidos en la columna y se eluyeron durante 120 minutos usando una columna de fase inversa (C18, 2µm, 100A, 50µm x 150mm) Columna Easy-Spray Columna PepLC RSLC (P/N ES801) adecuada para separar complejos de proteínas con un alto grado de resolución. La velocidad de flujo utilizada para la nano columna fue de 300 nL min⁻¹ y el rango de solvente de 7% B (5 min) a 35% (120 min). El disolvente A era ácido fórmico al 0,1% en agua, mientras que B era ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. El volumen de inyección fue de 2 µl. El equipo de MS tiene una célula de disociación de alta colisión (HCD) para fragmentación y un analizador Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific). Se usó un voltaje de 3,5 kV para la ionización por electro aspersion (Easy-Spray; Thermo Scientific). Se usó el software XCalibur 3.0.63 (Thermo Scientific) para la adquisición de datos y la configuración del equipo que permite la identificación de péptidos al mismo tiempo que su

separación cromatográfica. Los espectros de masas de exploración completa se adquirieron en el analizador Orbitrap. El rango de masa escaneada fue de 400-1800 m/z, a una resolución de 70000 a 400 m/z, y los doce iones más intensos en cada ciclo fueron aislados secuencialmente, fragmentados por HCD y medidos en el analizador Orbitrap. Los péptidos con una carga de +1 o con un estado de carga no asignado se excluyeron de la fragmentación para MS2.

Análisis de datos del MS

Los datos brutos exactos se procesaron utilizando el software Proteome Discoverer (versión 2.1.1.21 Thermo Scientific) y se realizaron búsquedas en base de datos de secuencias de proteínas UP000000586 de *Streptococcus pneumoniae* (cepa ATCC BAA-255 R6) con especificidad de tripsina y un máximo de una escisión perdida por péptido. Las búsquedas de Proteome Discoverer se realizaron con una tolerancia de masa precursora de 10 ppm y una tolerancia de iones del producto a 0,05 Da. Las modificaciones estáticas se ajustaron a la carbamidometilación de Cisteína, y las modificaciones dinámicas se ajustaron a la oxidación de Metionina y la acetilación N-terminal. Los impactos de proteínas se filtraron para coincidencias de péptidos de alta confianza con una tasa máxima de descubrimiento falso de proteínas y péptidos del 1% calculada mediante el empleo de una estrategia de base de datos inversa.

Proteome Discoverer calcula un área para cada proteína en cada condición. Para hacer esto, utiliza el área bajo la curva de los 3 péptidos más intensos para una proteína. Se calcularon las áreas para cada uno de los tres triplicados y se normalizaron. Los datos obtenidos para el área de cada proteína se procesaron con el programa Perseus (Max Planck Institute of Biochemistry, versión 1.5.5.3, disponible de forma gratuita) que permite un análisis estadístico más profundo. Se realizaron diferentes diagramas de dispersión de acuerdo con las muestras comparadas. Para cada par de muestras, se graficó el valor p de registro (-log Student t-test p-value A_B) en el eje y versus Student T-test Difference A_B en el eje x. Las proteínas que aparecen en el Volcano plot con un cambio de expresión mayor a 2 (menor que -1 o mayor que 1 en el eje x del gráfico) y un valor p <0,05 (superior a 1.3 en el eje y del gráfico) se consideraron expresadas diferencialmente.

Análisis de proteínas por ensayos de Western blots

Las células A549 se lisaron con solución de Laemmli conteniendo 5% de β -mercaptoetanol y se hirvieron durante 5 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y se cargaron 40 μ g de cada muestra

en geles SDS-PAGE al 15% y se sometieron a electroforesis para la resolución de la proteína a temperatura ambiente utilizando buffer de corrida Tris-Glicina-SDS en un campo eléctrico constante de 100 V cm⁻¹. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF, mediante transferencia semi-seca. Las membranas se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche a 4 ° C con anticuerpos primarios diluidos a 1: 1000 en PBS con albúmina de suero bovino al 5%. Después de lavar 3 veces con solución salina tamponada con Tris (TBS) con Tween al 0,5% (v / v), las membranas se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario conjugado con Alexa (dilución 1: 1,000) para detectar LC3-II, p62, β-actina y M2. Imágenes de fluorescencia fueron capturadas usando el equipo Oddisey CLx Imaging (LI-COR), y las bandas se cuantificaron mediante densitometría con el software Image Studio (LI-COR). El anticuerpo monoclonal de conejo contra LC3A/B (D3U4C) XP (R) (12741P) se obtuvo de Cell Signaling Technology; el anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína M2 de Influenza A [14C2] (ab5416) se obtuvo de Abcam; el anticuerpo monoclonal de conejo recombinante contra SQSTM1/p62 (701510) se compró a Invitrogen.

Ensayos de microscopía de fluorescencia

Para los ensayos de microscopía, las células A549 fueron sembradas sobre un cubreobjeto. Luego de los tratamientos realizados, las células se lavaron 3 veces con PBS y luego fijadas con paraformaldehído al 4%, por 10 minutos. A continuación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron 15 minutos con PBS y Hoescht (1:1000) para teñir el ADN. El montaje sobre portaobjetos se realizó utilizando Mowiol 488. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de epifluorescencia (Leica DMI8) y en un microscopio confocal (Olympus FV1200). Las imágenes fueron procesadas, posteriormente, utilizando el software FIJI.

Tablas y Anexos

Tablas y Anexos

Tabla S1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este trabajo.

Cepas o plásmidos	Características Relevantes	Referencias
Cepas		
<i>S. pneumoniae</i>		
R801	Derivada de R6; <i>hexB</i> Sm ^S	1
R806	R801, con la variante del gen <i>rpsL1</i> obtenida mediante transformación con el producto de PCR amplificado usando los primers FrpsL and RrpsL de ADN cromosomal de CP1296; Sm ^R	Este trabajo
RC830	R806 $\Delta comE::kan-rpsL+$, obtenida mediante el sistema de cassette Janus (amplificado a partir CP1296) y ADN de neumococo amplificado con los primers FcomE1, RcomE1, FcomE2 and RcomE2. Km ^R , Sm ^S .	Este trabajo
RC831	R801, <i>comE</i> ^{D58A}	6
RC836	R801, <i>comE</i> ^{T128A} obtenida mediante transformación con pTOPO-comET128A	6
RC874	R806 $\Delta ciaR::kan-rpsL+$, obtenida mediante el sistema de cassette Janus (amplificado a partir CP1296) y ADN de neumococo amplificado con los primers FciaR1, RciaR1, FciaR2 and RciaR2. Km ^R , Sm ^S .	Este trabajo
RC875	RC874 $\Delta ciaR$, obtenida mediante el reemplazo del cassette Janus con ADN de neumococo amplificado con los primers FciaR1, RciaR1, FciaR2 and RciaR2. Km ^S , Sm ^R .	Este trabajo
RC1060	R806 $\Delta stkP::kan-rpsL+$, obtenida mediante el sistema de cassette Janus (amplificado a partir CP1296) y ADN de neumococo amplificado con los primers FstkP1, RstkP1, FstkP2 and RstkP2. Km ^R , Sm ^S .	Este trabajo
RC1062	R801 <i>stk</i> ^{PK42R} obtenida mediante transformación con pTOPO- <i>stk</i> ^{PK42R}	6
R860	R806 $\Delta visR::kan-rpsL+$, obtenida mediante el sistema de cassette Janus (amplificado a partir CP1296) y ADN de neumococo amplificado con los primers FvisR1, RvisR1, FvisR2 and RvisR2. Km ^R , Sm ^S .	Este trabajo
R861	R860 $\Delta visR$, obtenida mediante el reemplazo del cassette Janus con ADN de neumococo amplificado con los primers FvisR1, RvisR1, FvisR2 and RvisR2. Km ^S , Sm ^R .	Este trabajo
R862	R806, $\Delta visH::kan-rpsL+$, obtenida mediante el sistema de cassette Janus (amplificado a partir CP1296) y ADN de neumococo amplificado con los primers FvisH1, RvisH1, FvisH2 and RvisH2. Km ^R , Sm ^S .	Este trabajo
R863	0001, $\Delta visH$, obtenida mediante el reemplazo del cassette Janus con ADN de neumococo amplificado con los primers FvisH1, RvisH1, FvisH2 and RvisH2. Km ^S , Sm ^R .	Este trabajo

Cepas o plásmidos	Características Relevantes	Referencias
R870	R806, $\Delta clpL::kan-rpsL^+$, obtenida mediante el sistema de cassette Janus (amplificado a partir CP1296) y ADN de neumococo amplicado con los primers FclpL1, RclpL1, FclpL2 and RclpL2. Km ^R , Sm ^S .	Este trabajo
R880	R806, $\Delta psaB::kan-rpsL^+$, obtenida mediante el sistema de cassette Janus (amplificado a partir CP1296) y ADN de neumococo amplicado con los primers FpsaB1, RpsaB1, FpsaB2 and RpsaB2. Km ^R , Sm ^S	Este trabajo
R890	R806, but $\Delta sodA::kan-rpsL^+$, obtenida mediante el sistema de cassette Janus (amplificado a partir CP1296) y ADN de neumococo amplicado con los primers FpsaB1, RpsaB1, Fpsa+A2:C20B2 and RpsaB2. Km ^R , Sm ^S	Este trabajo
RC900	R801 <i>hk01::ery</i> ; Ery ^R .	2
RC920	R801 <i>hk02::km</i> , Km ^R .	2
RC930	R801 <i>hk03::ery</i> ; Ery ^R .	2
RC940	R801 <i>hk04::ery</i> , Ery ^R .	2
RC960	R801 <i>hk06::ery</i> , Ery ^R .	2
RC970	R801 <i>hk07::ery</i> ; Ery ^R .	2
RC980	R801 <i>hk08::ery</i> ; Ery ^R .	2
RC990	R801 <i>hk09::ery</i> ; Ery ^R .	2
RC1010	R801 <i>hk10::ery</i> ; Ery ^R .	2
RC1020	R801 <i>hk11::ery</i> ; Ery ^R .	2
RC1030	R801 <i>hk13::ery</i> ; Ery ^R .	2
RC1040	R801 <i>rr14::ery</i> ; Ery ^R .	2
RCM379	R801 <i>atpC^{A49T}</i> , Opt ^R	5
CP1296	Derivada de la cepa Rx; <i>hex mal rpsL1 cbp3::kan-rpsL⁺</i> (Janus) Km ^R Sm ^S D39 <i>cpsB::ery</i> , obtenida mediante transformación con pVA891cpsB, Ery ^R	3
Escherichia coli		
TOP10	Amp ^R , Kan ^R , <i>lacZα+</i> selection. F ⁻ <i>mcrA</i> D(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZDM15</i> <i>DlacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD</i> 139D (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
DH5a	F ⁻ , F80 <i>dlacZDM15</i> , D(<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk⁻</i> , <i>mk⁺</i>), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	
Plasmidos		
pCR2.1-TOPO	Vector para clonados de productos de PCR; Ap ^R .	Invitrogen

Cepas o plásmidos	Características Relevantes	Referencias
pIRES2-EGFP	Vector para expresión de un gen y deEGFP en un solo transcripto	Novagen
pIRES2-EGFP-M2	Vector para expresión de la proteína viral M2 en células eucariotas	
pJDC9	Vector integrativo para <i>S. pneumoniae</i> ; Ery ^R	4
pJDChk01	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.3 kb del gen <i>hk01</i>	2
pJDChk03	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.42 kb del gen <i>hk03</i>	2
pJDChk04	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.33 kb del gen <i>hk04</i>	2
pJDChk06	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.32 kb del gen <i>hk06</i>	2
pJDChk07	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.26 kb del gen <i>hk07</i>	2
pJDChk08	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.36 kb del gen <i>hk08</i>	2
pJDChk09	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.41 kb del gen <i>hk09</i>	2
pJDChk10	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.36 kb del gen <i>hk10</i>	2
pJDChk11	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.39 kb del gen <i>hk11</i>	2
pJDChk13	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.44 kb del gen <i>hk13</i>	2
pJDCrr14	pJDC9 conteniendo un amplicon de 0.3 kb del gen <i>rr14</i>	2

Referencias

- 1) Lefevre JC, Claverys JP, Sicard AM. Donor deoxyribonucleic acid length and marker effect in pneumococcal transformation. 1979. *J. Bacteriol.* 138:80-6.
- 2) Cortes PR, Piñas GE, Cian MB, Yandar N, Echenique J. Stress-triggered signaling affecting survival or suicide of *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Med Microbiol.* 2015 Jan;305(1):157-69.
- 3) Sung CK, Li H, Claverys JP, Morrison DA. An *rpsL* cassette, Janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Nov;67(11):5190-6.
- 4) Chen JD, Morrison DA. Cloning of *Streptococcus pneumoniae* DNA fragments in *Escherichia coli* requires vectors protected by strong transcriptional terminators. *Gene.* 1987. 55(2-3):179-87.
- 5) Cortes PR, Orio AG, Regueira M, Piñas GE, Echenique J. 2008. Characterization of in vitro generated and clinical optochin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentina. *J Clin Microbiol.* 46:1930-4.
- 6) Pinas GE, Reinoso-Vizcaino NM, Yandar Barahona NY, Cortes PR, Duran R, Badapanda C, et al. Crosstalk between the serine/threonine kinase *StkP* and the response regulator *ComE* controls the stress response and intracellular survival of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* 2018;14(6):e1007118.

Tabla S2. Primers usados en este trabajo

Primers	Secuencias de ADN (5'-3')	Gen que amplifica	Sitios de Restricción
FrpsI	GACGTGCTGACAAATGTTGC	<i>rpsL</i>	
RrpsL	AATGTCGACTAGATCTTCCCTTATGCTTTTGGAC	<i>rpsL</i>	
F-Janus2	TTGGATCCGCTAGCCTCGAGAAGCTTGAACAAGTTATTACTTGAAGATGTCAG	<i>Janus cassette</i>	BamHI/NheI/ XhoI/HindIII
R-Janus2	AAGTCGACATCGATAGATCTTCTAGACCCCTTCCCTTATGCTTTTGGAC	<i>Janus cassette</i>	Sall/ClaI/ BglII/XbaI
FvisR1-hlp	CCTCAATCTGCCAACTAAAGG	<i>spr1475</i>	
R-MvisR1	CTTGTTCCGTCGACATCGATCCCAATCTGTTGACGAATGA	<i>spr1475</i>	Sall/ClaI
F-MvisR2	GGAAAGGGGTCGACATCGATCAGGGATTGGTAGGATTTATCG	<i>visH(hk01)</i>	Sall/ClaI
RvisR2-hlp	CCGACCTCAGACTCGATACG	<i>visH(hk01)</i>	
F-MvisH1	TTAATGGTTATCACTGGTGTGACG	<i>visR(rr01)</i>	Sall/ClaI
R-MvisH1	CTTGTTCCGTCGACATCGATAAAGACGACTACGGGAGCG	<i>visR(rr01)</i>	Sall/ClaI
F-MvisH2	GGAAAGGGGTCGACATCGATAACGACAGTCCGGATTGATCAGT	<i>thrS</i>	
R-MvisH2	GAGCTGATGGCGAAGATCAC	<i>thrS</i>	
F1M-clpL	CTTGACAGACGGTGTGACG	<i>mryA</i>	
R1M-clpL	GTTGTTGTCGACGGATCCTTACATCAATTGGTTAAATAAATCATCC	<i>mryA</i>	Sall/BamHI
F2M-clpL	GGAGTTGTCGACGGGATCCGGAAGCAGATATGGAAGATGG	<i>luxS</i>	Sall/BamHI
R2M-clpL	AATCGATCATCTCGGTAGCC	<i>luxS</i>	
FsodA1-Jn	GCCATTGAAGAAAGTCAGAAGTTGAC	<i>hola</i>	
RsodA1-Jn	CTGATGTCGACGGATCCAGCGGGTGTAGTTTCAACAAATGTC	<i>hola</i>	Sall/BamHI
FsodA2-Jn	ATCTAACTCGAGAGACTCTAATGATAGTTGGAGGGAAGAATTGTTTC	<i>spr0675</i>	
RsodA2-Jn	TCAAAGGGCTCACCGATTCC	<i>spr0675</i>	
FpsaB1-Jn	AGAAAGGCACGGCTGTAGG	<i>pepO</i>	
RpsaB1-Jn	AATCAAAGATCTAAAAAGCTTAACGTATCATAAACTTGTATTCTTCTTGTGTC	<i>pepO</i>	BglII/HindIII
FpsaB2-Jn	ATATCAGGATCCAAGCTTATGATTGCAGAATTTATCGATGGATT	<i>psaC</i>	BamHI/HindIII
RpsaB2-Jn	AACGTCTTCAGGAAGTGGTTCG	<i>psaC</i>	
FM2int	CCTATCAGAAACGAATGGGG	<i>IAV m2</i>	
FM2-NHE	AATGCTAGCCACCATGAGTCTTCTAACCAGGTGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGG	<i>IAV m2</i>	NheI
RM2-FLAG-ECO	ATAAATGAATTCTTACTTATCATCGTCGTCCTTTGTAGTCCTCCAGCTCTATGCTGACAAA	<i>IAV m2</i>	EcoRI
FgyrA-RT	GGAGATAGTGCTGCCGCTCAACG	<i>gyrA</i>	
RgyrA-RT	GGCAAGACCAAGGGTCCCGTTC	<i>gyrA</i>	
FclpL-RT	CGAAACTTGACAGCAGAAGCG	<i>clpL</i>	
RclpL-RT	CGGCGTGAGAGGATTTTCCAGATG	<i>clpL</i>	
Frr01-RT	GGGCGGATGACTTTGTGACC	<i>rr01/visR</i>	
Rrr01-RT	CTCATAGGAACGACGCAACAAGC	<i>rr01/visR</i>	
FpsaB-RT	GATGAACCCTTTGCTGGGATTG	<i>psaB</i>	
RpsaB-RT	TCTTGCTGAGGTCGTGGTGAAC	<i>psaB</i>	
FmurN-RT	AGGCTGAAACCTTTGGCATTCT	<i>murN</i>	
RmurN-RT	AGCTTGCTATGAGAACTCCGC	<i>murN</i>	
FaroC-RT	TGTCTTACTTCGGGCGTTCG	<i>aroC</i>	
RaroC-RT	CAGCCATTTCTGGTGGTCCTTA	<i>aroC</i>	
FglyA-RT	AACCACATTCAGGAAGCCAAGC	<i>glyA</i>	

Primers	Secuencias de ADN (5'-3')	Gen que amplifica	Sitios de Restricción
RglyA-RT	GCTGCCAAATCCATTCCCATAA	<i>glyA</i>	
FcomE1	GAGGGATAGAGGACTATTCCTAAGTTT	<i>comD</i>	
RcomE1	GAAGGGGTCGACATCGATTTATCTCTCTAGTCTCACTTGATGTTCA	<i>comD</i>	SalI/ClaI
FcomE2	GAAGGGGTCGACATCGATTTCTATGAAGACCATCGTTGTCC	<i>tRNA-glu</i>	SalI/ClaI
RcomE2	CCCGATCATGACAATAATAAAGG	<i>tRNA-glu</i>	
FciaR1	GAGACTTGTTAGAAGCTGTTCTTGC	<i>pepN</i>	
RciaR1	GATACGGTCGACGGATCCTTATAGGTCATCCTCAACCAATAAGATTT	<i>pepN</i>	SalI/BamHI
FciaR2	GAAGGGGTCGACGGATCCTCCGTAAGAAATTAAGGGAACC	<i>ciaH</i>	SalI/BamHI
RciaR2	AAGCAATCATCTCATAGTTTGTGAA	<i>ciaH</i>	
Fstk1	AACTTATAGCACCTGCACTATCG	<i>phpP</i>	
RstkP1m	GAAGGGGTCGACGGATCCTTAAACCTTCACTGCCACTTCTTCC	<i>phpP</i>	SalI/BamHI
Fstk2	TTAGTCGACGCTACTCCTTAAAGCAGATGGA	<i>spr1576</i>	SalI
Rstk2	ACCGTTGCACATTGAGTACG	<i>spr1576</i>	

Tabla S3. Resumen de genes expresados diferencialmente en la mutante *comE^{T128A}* (RNA-seq)

Función	Gen	Veces de cambio	p-Valor
<i>Estrés oxidativo</i>	<i>spxB</i>	-18.25	<0.001
	<i>spr0643</i>	-9.76	0.01
	<i>spr1495 tpxD or psaD</i>	-2.73	0.03
	<i>spr0674 sodA</i>	-2.78	0.02
	<i>spr1175 flaV</i>	-3.17	0.02
	<i>spr1064 nrdH</i>	-2.75	0.04
<i>Metabolismo de purina/pirimidina</i>	<i>spr1663 pbuX</i>	-4.89	0.01
	<i>spr1662 xpt</i>	-4.89	0.01
	<i>spr0022 ada</i>	-3.23	0.03
	<i>spr1128 guaC</i>	-3.08	0.02
	<i>spr1165 pyrP</i>	-2.98	0.02
	<i>spr1090 udK</i>	-2.74	0.02
<i>Metabolismo</i>	<i>spr0415 pfl</i>	-6.65	<0.001
	<i>spr0026 pca</i>	-3.7	0.01
	<i>spr1358 pgl</i>	-2.98	0.02
	<i>spr0887 gpmB</i>	-2.38	0.04
	<i>spr0234 gldA</i>	2.46	0.04
	<i>spr1834 ptcC</i>	3.07	0.02
	<i>spr0226 pflE</i>	3.21	0.03
	<i>spr0135 epsG</i>	3.39	0.04
	<i>spr1468 ywnB</i>	>20	0.002
	<i>spr1185 nagC</i>	>20	0.03
	<i>spr0280 celC</i>	>20	0.04
	<i>Metabolismo de aminoácidos</i>	<i>spr0918 asd</i>	-3.31
<i>spr0729 folD</i>		-2.62	0.04
<i>spr1120 glnP, spr1121 glnQ</i>		-2.57	0.03
<i>spr1938 ulaA</i>		3.57	0.02
<i>Transporte de metabolitos</i>	<i>spr2004 ABC-MSP</i>	-8.91	<0.001
	<i>spr2002 ABC-NBD</i>	-5.24	<0.001
	<i>spr0327 aliA</i>	-2.78	0.03
	<i>spr0619 ABC-NBD, spr0618</i>	2.88	0.03
	<i>spr1546 ABC-NBD</i>	3.4	0.03
	<i>spr1801 ABC-NBD, spr1800</i>	3.48	0.03
	<i>spr1281 ABC-NBD</i>	3.77	0.04
	<i>spr1939</i>	>20	<0.001
	<i>spr0424 lacG</i>	>20	<0.001
	<i>spr0811</i>	>20	0.01

Función	Gen	Veces de cambio	p-Valor
<i>Estructuras ribosomales, Transducción</i>	<i>spr1177 rpmE2</i>	-4.12	0.002
	<i>spr1467 rpsO</i>	-4.03	0.001
	<i>spr0920 trmE</i>	-3.29	0.01
	<i>spr0271 rplM</i>	-3.2	0.01
	<i>spr0248 rpsI</i>	-3.06	0.01
	<i>spr0189 rplD</i>	-2.92	0.03
	<i>spr0190 rplW</i>	-2.92	0.03
	<i>spr0248 rpsL</i>	-2.76	0.02
	<i>spr0187 rpsJ</i>	-2.54	0.03
	<i>spr0626 lysS</i>	-2.55	0.03
	<i>spr1014 rpmA</i>	-2.47	0.04
	<i>spr1931 hisS</i>	-2.4	0.04
	<i>spr0191 rplB</i>	-2.3	0.04
	<i>spr1116 rimI ,spr1117 rimL</i>	3.14	0.01
	<i>spr2011 raiA</i>	3.85	0.003
	<i>sprt19 tRNA-Met3</i>	>20	0.04
	<i>sprt36 tRNA-Thr3</i>	>20	0.001
	<i>sprt25 tRNA-Leu3</i>	>20	0.004
	<i>sprt13 tRNA-Ile1</i>	>20	0.02
	<i>sprt28 tRNA-Val1</i>	>20	0.03
	<i>sprt38 tRNA-Lys3</i>	>20	0.03
	<i>sprt50 tRNA-Ser4</i>	>20	0.03
	<i>sprt21 tRNA-Arg3</i>	>20	0.03
	<i>sprt33 tRNA-Arg4</i>	>20	0.03
	<i>sprt16 tRNA-Met1</i>	>20	0.04
	<i>Bacteriocinas/transporte de bacteriocinas</i>	<i>spr1352 bta</i>	-3.59
<i>spr1765 pneA1</i>		2.51	0.03
<i>spr0128</i>		>20	0.03
<i>Chaperonas moleculares</i>	<i>spr1993 hslO</i>	-3.57	0.01
	<i>spr0456 dnaJ</i>	-2.32	0.04
<i>Regulación génica</i>	<i>spr1731 lytT</i>	-3.11	0.02
	<i>spr0228 deoR</i>	3.47	0.02
	<i>spr1720</i>	>20	0.01
	<i>spr1301 mngR</i>	>20	0.01
	<i>spr1946 albA_2</i>	>20	0.01
	<i>spr1752,spr1753 hipB</i>	>20	0.03
	<i>spr0225 araC</i>	>20	0.04
<i>Transporte de cationes</i>	<i>spr0905 yfnA</i>	-2.85	0.04
<i>Biosíntesis de pared celular</i>	<i>spr0890 acm</i>	-2.65	0.03

Función	Gen	Veces de cambio	p-Valor
	<i>spr0989 murZ</i>	-2.57	0.03
	<i>spr0541 murN</i>	2.44	0.03
<i>División celular</i>	<i>spr2046 spo0J/parB</i>	2.57	0.03
<i>Metabolismo de hierro</i>	<i>spr1684 fatD, spr1685 fatC</i>	3.36	0.003
	<i>spr1686 fecE</i>	3.36	0.003
	<i>spr1687 fatB</i>	3.8	0.004
<i>Otros</i>	<i>spr0722</i>	-7.29	0.01
	<i>spr0312</i>	-4.08	0.01
	<i>spr1660 exoA</i>	-3.75	0.01
	<i>spr0679 ppiA</i>	-3.61	0.02
	<i>spr1038</i>	-3.21	0.02
	<i>spr1790 yidC2</i>	-3.5	0.01
	<i>spr0364 spi</i>	-2.84	0.01
	<i>spr1907 dapD</i>	-2.57	0.04
	<i>spr1544 secA</i>	-2.48	0.03
	<i>spr1858 comGG/cglG</i>	>20	0.01
	<i>,spr1859 comGF</i>	>20	0.01
	<i>spr1934 paaD</i>	>20	0.04
	<i>spr0020 comW</i>	>20	0.001
<i>Función desconocida</i>	<i>spr1091</i>	-3.12	0.02
	<i>spr0080</i>	-2.72	0.03
	<i>spr1093</i>	2.52	0.04
	<i>spr1484</i>	2.82	0.01
	<i>spr0703</i>	3.3	0.01
	<i>spr0806</i>	3.4	0.01
	<i>spr1406</i>	3.81	0.04
	<i>spr1914</i>	>20	0.002
	<i>spr0407</i>	>20	0.03
	<i>spr1873</i>	>20	0.03
	<i>spr1987</i>	>20	0.03
	<i>spr0742</i>	>20	0.04

Nota: *p-valor*<0,01 se informan como 0,00.

Tabla S4. Resumen de genes expresados diferencialmente en la mutante Δ visR (RNA-seq)

Función	Gen	Veces de cambio	p-Valor
<i>Metabolismo de glucurónico</i>	<i>gno</i>	-6.22	0.02
	<i>spr0084,spr0085</i>	-7.84	0.00
	<i>kdgK</i>	-4.64	0.04
	<i>kdgA</i>	-4.47	0.03
	<i>spr0289</i>	-4.04	0.04
<i>Estructuras ribosomales y de transducción</i>	<i>tRNA-Trp</i>	-8.28	0.04
	<i>spr0112</i>	-5.53	0.03
	<i>rpmI</i>	-4.88	0.02
	<i>rpsO</i>	-4.68	0.00
	<i>rpmH</i>	-4.55	0.03
	<i>rpsU</i>	-4.35	0.00
	<i>spr1942</i>	-4.63	0.03
	<i>rpmA</i>	-2.65	0.02
	<i>rpmG</i>	-3.49	0.02
	<i>rplT</i>	-3.20	0.01
	<i>rRNA_5S-2</i>	-3.12	0.01
	<i>rRNA_5S-4</i>	-3.09	0.01
	<i>rRNA_5S-3</i>	-3.04	0.01
	<i>rRNA_5S-1</i>	-2.93	0.01
	<i>frf</i>	-2.69	0.02
	<i>infC</i>	-2.63	0.03
	<i>rpsM</i>	2.55	0.03
<i>ftsY</i>	3.02	0.01	
<i>Metabolismo Central</i>	<i>spr1402 SsuE</i>	-3.91	0.00
	<i>atpE</i>	-3.49	0.02
	<i>ptsH (Hpr)</i>	-3.44	0.01
	<i>ppc</i>	2.67	0.01
	<i>strH</i>	2.77	0.01
	<i>pulA</i>	3.04	0.02
	<i>folE,sulB</i>	3.17	0.01
	<i>pdxK,spr1449,truA</i>	3.22	0.04
	<i>adhE</i>	3.43	0.01
	<i>ribA</i>	3.44	0.01
	<i>pcp</i>	3.88	0.00
	<i>npIT</i>	4.07	0.01
	<i>transposase_H-truncation</i>	4.09	0.04
	<i>PTS-EII</i>	4.13	0.03
	<i>PTS-EIIB,bgaC</i>	4.19	0.01
	<i>estA</i>	5.33	0.00
	<i>PTS-EII</i>	5.87	0.00

Función	Gen	Veces de cambio	p-Valor
	<i>PTS-EIIC,PTS-EIID</i>	6.30	0.00
<i>Homeostasis redox</i>	<i>nrdH</i>	-3.98	0.01
	<i>nrdD</i>	-2.46	0.03
<i>Transporte/metabolismo de aminoácidos</i>	<i>gpmB</i>	-3.44	0.00
	<i>dapD</i>	-2.57	0.04
	<i>cysE</i>	2.31	0.04
	<i>carB</i>	2.54	0.03
	<i>glyA,spr0930</i>	2.55	0.04
	<i>aroD,aroE</i>	2.81	0.03
	<i>thrC</i>	2.83	0.02
	<i>ilvA</i>	3.51	0.02
	<i>leuB,spr1134</i>	4.35	0.01
	<i>tyrA</i>	4.40	0.00
	<i>aroC</i>	4.52	0.00
	<i>aroB</i>	5.61	0.00
	<i>dagA</i>	6.53	0.01
	<i>glnP</i>	8.19	0.02
<i>Bacteriocinas/transporte de bacteriocinas</i>	<i>spr1764 CylM precursor</i>	-4.64	0.03
	<i>spr0098 bacteriocin</i>	-3.90	0.02
	<i>bta (bacteriocin transporter)</i>	-3.77	0.00
	<i>spr1766 PneA2</i>	-3.62	0.01
	<i>spr1765 PneA1</i>	-2.84	0.02
	<i>cylM</i>	2.64	0.02
	<i>spr1091</i>	-3.64	0.01
	<i>transposase_A</i>	-3.62	0.02
<i>Chaperonas moleculares</i>	<i>clyB,spr1768,spr1769</i>	2.92	0.02
	<i>clpL</i>	-3.30	0.01
	<i>groEL</i>	-2.56	0.04
<i>Transducción de señales</i>	<i>spr1731 (LytR)</i>	-3.16	0.01
	<i>hk01,rr01</i>	-3.00	0.03
	<i>hk07,spr0152</i>	3.24	0.04
<i>Transporte de iones metálicos</i>	<i>dpr</i>	-3.14	0.03
	<i>psaB, psaC</i>	-2.91	0.02
	<i>appC</i>	4.02	0.02
	<i>ctpE</i>	4.21	0.00
	<i>lmb</i>	4.32	0.01
	<i>nha2</i>	4.72	0.00
	<i>ABC-MSP,cbiO,pgsA</i>	5.50	0.00

Función	Gen	Veces de cambio	p-Valor
<i>Metabolismo de purinas/pirimidinas</i>	<i>pyrH</i>	-3.08	0.01
	<i>apt</i>	-2.58	0.02
	<i>relA</i>	-2.33	0.04
	<i>adk</i>	2.96	0.02
<i>División celular</i>	<i>spr0332 GpsB o LocZ</i>	-3.06	0.01
	<i>mreC,mreD</i>	4.85	0.01
	<i>dacA</i>	4.93	0.00
<i>Transporte de metabolitos</i>	<i>ABC-MSP</i>	-2.65	0.03
	<i>mscL</i>	-2.77	0.04
	<i>ABC-NBD</i>	2.55	0.04
	<i>potA,potB,potC,potD</i>	2.68	0.02
	<i>amiC,amiD</i>	2.69	0.03
	<i>ABC-NP</i>	3.22	0.04
	<i>vex1</i>	3.42	0.03
	<i>vex3</i>	3.67	0.01
	<i>ABC-N%2FP</i>	3.33	0.01
	<i>pncP</i>	4.19	0.04
	<i>MATE_transporter</i>	4.52	0.00
	<i>ABC-NBD,spr0618</i>	6.17	0.00
	<i>nirC</i>	12.64	0.03
<i>Biosíntesis de pared celular</i>	<i>pgdA</i>	-2.44	0.03
	<i>murM</i>	2.53	0.03
	<i>murN</i>	4.47	0.00
<i>Competencia</i>	<i>dinF</i>	2.38	0.04
	<i>endA</i>	2.90	0.02
	comX2	4.29	0.04
	<i>cinA</i>	4.29	0.00
<i>Genes capsulares</i>	<i>cps2I,cps2J</i>	3.29	0.04
	<i>cps2L</i>	3.44	0.04
<i>Reparación de ADN</i>	<i>rexA,rexB</i>	2.33	0.04
	<i>recG</i>	2.45	0.04
	<i>ung</i>	2.55	0.02
	<i>recD</i>	3.20	0.01
<i>Metabolismo de colina</i>	<i>licD1</i>	2.92	0.04
	<i>lytD</i>	3.04	0.01
	<i>licB,pck</i>	3.21	0.01

Función	Gen	Veces de cambio	p-Valor
	<i>pcpA</i>	3.18	0.01
	<i>chpD</i>	8.98	0.01
Otros	<i>rnpB</i>	-4.03	0.02
	<i>hlpA</i>	-2.58	0.04
	<i>transposase_F</i>	2.41	0.04
	<i>trzA</i>	2.78	0.03
	<i>IS1167</i>	2.88	0.02
	<i>yjfA</i>	3.09	0.02
	<i>rnhB</i>	3.18	0.02
	<i>pepXP</i>	4.05	0.01
	<i>iga</i>	4.16	0.00
	<i>rpoA</i>	4.62	0.00
	<i>IS1167-truncation</i>	5.33	0.01
	<i>hsdS</i>	5.92	0.00
	<i>IS1167</i>	6.18	0.00
	<i>IS1167</i>	11.83	0.03
Función desconocida	<i>spr0586</i>	-6.61	0.00
	<i>spr1601</i>	-4.70	0.00
	<i>spr0175</i>	-4.23	0.00
	<i>spr0055</i>	-3.54	0.02
	<i>spr1470</i>	-3.36	0.04
	<i>spr0283</i>	-3.29	0.01
	<i>spr1925</i>	-3.16	0.01
	<i>spr0111</i>	-3.15	0.02
	<i>spr0726</i>	-2.96	0.01
	<i>spr1465</i>	-2.95	0.03
	<i>spr0176</i>	-2.88	0.01
	<i>spr0155</i>	-2.48	0.04
	<i>spr0033</i>	-2.73	0.03
	<i>spr0652</i>	-2.66	0.03
	<i>spr0931</i>	-2.63	0.02
	<i>spr1484</i>	2.33	0.04
	<i>spr1201</i>	2.43	0.03
	<i>spr1052</i>	2.48	0.03
	<i>spr0518</i>	2.48	0.03
	<i>spr2029,spr2030</i>	2.54	0.03
	<i>spr0521</i>	2.56	0.02
	<i>spr1482</i>	2.58	0.03
	<i>spr1116,spr1117</i>	2.58	0.03
	<i>spr0616,spr0617</i>	2.61	0.04
	<i>spr1045</i>	2.71	0.02
	<i>spr1879</i>	2.75	0.03

Función	Gen	Veces de cambio	p-Valor
	<i>spr0949</i>	2.91	0.04
	<i>spr0328</i>	2.98	0.02
	<i>spr0574</i>	3.31	0.03
	<i>spr2028</i>	3.34	0.02
	<i>spr0760,spr0761</i>	3.38	0.00
	<i>spr0157</i>	3.44	0.03
	<i>spr1129,spr1130</i>	3.45	0.02
	<i>spr1190</i>	3.48	0.02
	<i>spr1386</i>	3.48	0.03
	<i>spr1195</i>	3.68	0.03
	<i>leuA-truncation</i>	3.71	0.01
	<i>spr1056</i>	3.81	0.00
	<i>spr0144</i>	3.90	0.02
	<i>ABC-NBD-truncation</i>	4.35	0.00
	<i>spr2036</i>	4.46	0.01
	<i>spr0559</i>	4.63	0.00
	<i>spr0468</i>	5.37	0.00
	<i>spr1230</i>	5.89	0.00
	<i>spr1708</i>	6.42	0.00
	<i>spr1876</i>	6.46	0.01
	<i>ABC-SBP-truncation</i>	9.02	0.01
	<i>spr0967,spr0968</i>	11.10	0.02
	<i>spr0522</i>	15.30	0.00

Nota: *p-valor*<0,01 se informan como 0,00.

Tabla S5. Resumen de proteínas expresadas diferencialmente en la mutante *ΔvisR* a pH 5,9
Número de Acceso de la proteína (gen) **Veces de Cambio** **p-valor**

Número de Acceso de la proteína (gen)	Veces de Cambio	p-valor
<i>Proteínas con expresión disminuida en la mutante</i>		
Q8DNA5 (<i>adhE</i>)	-6.78	0.00
Q8DPI3 (<i>tarJ</i>)	-6.41	0.01
Q8DPH2 (<i>pyrP</i>)	-4.81	0.05
Q8DPY3 (ABC-NBD)	-4.54	0.00
Q8DN70 (ABC-NP)	-4.06	0.00
Q8DR56 (<i>spr0333</i>)	-3.96	0.00
Q8CWQ5 (<i>murE</i>)	-3.61	0.01
Q8DNM8 (<i>trpB</i>)	-3.61	0.02
Q8DNR7 (<i>fmt</i>)	-3.53	0.00
Q8DPY7 (<i>spr0932</i>)	-3.35	0.00
Q8DN54 (<i>dapH</i>)	-3.25	0.00
Q8DND9 (<i>lysA</i>)	-3.20	0.00
Q8DNR8 (<i>sunL</i>)	-3.09	0.01
Q8DQK7 (<i>lctO</i>)	-3.06	0.00
Q8DR68 (<i>clpL</i>)	-3.05	0.01
Q8DP02 (<i>entB</i>)	-3.02	0.00
Q8DQD2 (<i>nnrD</i>)	-2.89	0.01
Q7ZAK3 (<i>cinA</i>)	-2.81	0.01
Q8DN05 (<i>pspC</i>)	-2.68	0.01
Q8DPZ9 (<i>dapA</i>)	-2.68	0.00
Q8DQ48 (<i>spr0847</i>)	-2.62	0.02
Q8DPU5 (<i>rex</i>)	-2.60	0.00
P0A4N0 (<i>amiD</i>)	-2.52	0.00
Q8DNR5 (<i>gmk</i>)	-2.46	0.01
Q8DNM9 (<i>trpA</i>)	-2.40	0.02
Q8CYU4 (<i>spr0929</i>)	-2.29	0.00
Q8DN51 (<i>ctpC</i>)	-2.27	0.02
Q8DR55 (<i>mapZ</i>)	-2.27	0.00
Q8DQT9 (<i>bglH</i>)	-2.16	0.01
Q8DRD7 (<i>nrdD</i>)	-2.14	0.01
Q8DQD5 (<i>glnP</i>)	-2.02	0.03
Q8DQN5 (<i>zmpB</i>)	-2.00	0.01
Q8DRD4 (<i>adk</i>)	-1.97	0.00
<i>Proteínas sobre-expresadas en la mutante</i>		
Q8DQB5 (<i>parE</i>)	2.04	0.01
Q8DNT1 (<i>nataA</i>)	2.07	0.00
Q8DQ89 (<i>hsdR</i>)	2.07	0.03
Q8DP68 (<i>spr1325</i>)	2.09	0.00
Q8DRA0 (<i>pepC</i>)	2.11	0.00
Q8DQR1 (<i>murM</i>)	2.11	0.03
P67050 (<i>thyA</i>)	2.14	0.02
Q8DPL5 (<i>fhs</i>)	2.15	0.00

Número de Acceso de la proteína (gen)	Veces de Cambio	p-valor
<i>Proteínas sobre-expresadas en la mutante</i>		
Q8DPU8 (<i>pcrA</i>)	2.16	0.01
Q8DP07 (<i>lytC</i>)	2.18	0.01
Q8DPH9 (<i>pyrB</i>)	2.20	0.04
Q8DNH2 (<i>spr1726</i>)	2.20	0.01
Q8DPP9 (<i>nrdH</i>)	2.21	0.00
Q8DPD0 (<i>spr1236</i>)	2.28	0.03
Q8DQ01 (<i>spr0554</i>)	2.30	0.00
Q8CYK7 (<i>spr1326</i>)	2.32	0.00
Q8DNE0 (<i>pflC</i>)	2.34	0.00
Q8DRA6 (<i>pulA</i>)	2.44	0.02
Q8DQ00 (ABC-NBD)	2.50	0.00
Q8DQ62 (<i>lytD</i>)	2.58	0.03
Q8DNN6 (<i>scrR</i>)	2.69	0.00
Q8DRN7 (<i>spr0033</i>)	2.69	0.00
Q8DNC5 (<i>spr1811</i>)	2.75	0.00
Q8CWP4 (<i>gtfA</i>)	2.91	0.01
P65145 (<i>infC</i>)	2.94	0.01
Q8DPD3 (<i>spr1230</i>)	3.02	0.01
P65947 (<i>pyrE</i>)	3.13	0.02
Q8DRK9 (<i>agaS</i>)	3.16	0.01
Q8DRL6 (<i>strH</i>)	3.47	0.02
P0A4M6 (<i>tpx</i>)	3.65	0.01
Q8DPQ4 (<i>ung</i>)	4.22	0.04
Q8DN31 (<i>spr1955</i>)	4.94	0.01
Q8CZ48 (<i>spr0457</i>)	5.20	0.01

Nota: *p-valor* < 0,01 se informan como 0,00.

Tabla S6. Resumen de proteínas expresadas diferencialmente en la mutante Δ visR a pH 7
Número de Acceso de la proteína (gen) **Veces de Cambio** **p-valor**

Número de Acceso de la proteína (gen)	Veces de Cambio	p-valor
<i>Proteínas con expresión disminuida en la mutante</i>		
Q8DN84 (<i>adh</i>)	-2.02	0.01
Q8DNA5 (<i>adhE</i>)	-4.31	0.00
Q8DQK7 (<i>lctO</i>)	-14.32	0.00
Q8DNW8 (<i>psaB</i>)	-2.02	0.00
Q8DN64 (<i>pstS2</i>)	-8.20	0.00
Q8CZ70 (<i>spr0309</i>)	-2.02	0.00
Q8DRD7 (<i>nrdD</i>)	-2.66	0.01
Q8DPU0 (<i>pta</i>)	-4.34	0.00
Q8DR68 (<i>clpL</i>)	-5.66	0.01
Q8DMW2 (<i>sphtra</i>)	-2.95	0.01
Q8DPU5 (<i>rex</i>)	-2.45	0.00
P67331 (<i>spr0084</i>)	-2.03	0.05
Q8DRN7 (<i>spr003</i>)	-2.37	0.00
P0A2V9 (<i>pstB3</i>)	-7.30	0.01
P0A3Y8 (<i>phoU</i>)	-43.66	0.02
P59676 (<i>pbpX</i>)	-2.20	0.04
Q8DRI7 (<i>ABC-NBD</i>)	-2.61	0.01
Q8DRM1 (<i>purH</i>)	-4.36	0.02
Q8DN55 (<i>spr1906</i>)	-2.92	0.00
Q8DRE5 (<i>corA</i>)	-3.11	0.05
Q8DQI5 (<i>spr0653</i>)	-3.12	0.01
Q8DPC6 (<i>spr1241</i>)	-2.12	0.00
Q8DPM1 (<i>spr1101</i>)	-2.28	0.04
<i>Proteínas sobre-expresadas en la mutante</i>		
Q8DNW3 (<i>spr1506</i>)	2.04	0.01
P0A4D8 (<i>cshA</i>)	2.07	0.00
Q8DQD7 (<i>clpE</i>)	2.07	0.03
Q8DP68 (<i>spr1325</i>)	2.09	0.00
Q8DQ70 (<i>spr0820</i>)	2.11	0.00
Q8CYK7 (<i>spr1326</i>)	2.11	0.03
Q8DQ30 (<i>rnr</i>)	2.14	0.02
Q8DQN1 (<i>rnz</i>)	2.15	0.00
Q8DNY2 (<i>ctpE</i>)	2.16	0.01
Q59947 (<i>iga</i>)	2.18	0.01
Q8DQ99 (<i>dacA</i>)	2.20	0.04
Q8CYD8 (<i>spr1623</i>)	2.20	0.01
Q8DP18 (<i>ABC-NBD</i>)	2.21	0.00
P67685 (<i>rsgA</i>)	2.28	0.03
Q8DPE4 (<i>trzA</i>)	2.30	0.00
Q8DPD1 (<i>aroB</i>)	2.32	0.00
Q8DQ67 (<i>but</i>)	2.34	0.00
Q8DQ69 (<i>nspC</i>)	2.44	0.02

Número de Acceso de la proteína (gen)	Veces de Cambio	p-valor
<i>Proteínas sobre-expresadas en la mutante</i>		
P66836 (<i>speE</i>)	2.50	0.00
Q8DMZ2 (<i>dnaC</i>)	2.58	0.03
Q8DRB5 (<i>spr0236</i>)	2.69	0.00
Q8DRA6 (<i>pulA</i>)	2.69	0.00
Q8DNC8 (<i>spr1805</i>)	2.75	0.00
Q8DQ73 (<i>cad</i>)	2.91	0.01
Q8DNS8 (<i>scrA</i>)	2.94	0.01
Q8DNF3 (<i>nisP</i>)	3.02	0.01
Q8DQS2 (<i>vex3</i>)	3.13	0.02
P0A4N4 (<i>malD</i>)	3.16	0.01
Q8DQ68 (<i>aguA</i>)	3.47	0.02
Q8DQ33 (<i>mutM</i>)	3.65	0.01
Q8DNE9 (<i>hlyX</i>)	4.22	0.04
Q8DQR4 (<i>recJ</i>)	4.94	0.01
Q8DNX5 (<i>spr1477</i>)	5.20	0.01
Q8DNK7 (<i>galK</i>)	6.22	0.00
Q8DQ62 (<i>lytD</i>)	4.96	0.00
Q8DNW3 (<i>spr1506</i>)	2.50	0.04

Nota: $p\text{-valor} < 0,01$ se informan como 0,00.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adegbola, R. A., R. DeAntonio, P. C. Hill, A. Roca, E. Usuf, B. Hoet, and B. M. Greenwood. 2014. 'Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: a systematic review and meta-analysis', *PLoS One*, 9: e103293.
- Aegerter, H., J. Kulikauskaite, S. Crotta, H. Patel, G. Kelly, E. M. Hessel, M. Mack, S. Beinke, and A. Wack. 2020. 'Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection', *Nat Immunol*, 21: 145-57.
- Agola, J. O., P. A. Jim, H. H. Ward, S. Basuray, and A. Wandinger-Ness. 2011. 'Rab GTPases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities', *Clin Genet*, 80: 305-18.
- Ali, Y. M., H. I. Kenawy, A. Muhammad, R. B. Sim, P. W. Andrew, and W. J. Schwaeble. 2013. 'Human L-ficolin, a recognition molecule of the lectin activation pathway of complement, activates complement by binding to pneumolysin, the major toxin of *Streptococcus pneumoniae*', *PLoS One*, 8: e82583.
- Altamirano-Silva, P., J. Meza-Torres, A. Castillo-Zeledon, N. Ruiz-Villalobos, A. M. Zuniga-Pereira, C. Chacon-Diaz, E. Moreno, C. Guzman-Verri, and E. Chaves-Olarte. 2018. 'Brucella abortus Senses the Intracellular Environment through the BvrR/BvrS Two-Component System, Which Allows B. abortus To Adapt to Its Replicative Niche', *Infect Immun*, 86.
- Andersson, B., J. Dahmen, T. Frejd, H. Leffler, G. Magnusson, G. Noori, and C. S. Eden. 1983. 'Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells', *J Exp Med*, 158: 559-70.
- Asmat, T. M., V. Agarwal, M. Saleh, and S. Hammerschmidt. 2014. 'Endocytosis of *Streptococcus pneumoniae* via the polymeric immunoglobulin receptor of epithelial cells relies on clathrin and caveolin dependent mechanisms', *Int J Med Microbiol*, 304: 1233-46.
- Avery, O. T., C. M. Macleod, and M. McCarty. 1944. 'Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii', *J Exp Med*, 79: 137-58.
- Balachandran, P., S. K. Hollingshead, J. C. Paton, and D. E. Briles. 2001. 'The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin', *J Bacteriol*, 183: 3108-16.
- Barchiesi, J., M. E. Castelli, G. Di Venanzio, M. I. Colombo, and E. Garcia Vescovi. 2012. 'The PhoP/PhoQ system and its role in *Serratia marcescens* pathogenesis', *J Bacteriol*, 194: 2949-61.
- Beale, R., H. Wise, A. Stuart, B. J. Ravenhill, P. Digard, and F. Randow. 2014. 'A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability', *Cell Host Microbe*, 15: 239-47.
- Bean, B., and A. Tomasz. 1977. 'Choline metabolism in pneumococci', *J Bacteriol*, 130: 571-4.
- Beilharz, K., L. Novakova, D. Fadda, P. Branny, O. Massidda, and J. W. Veening. 2012. 'Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E905-13.
- Berry, A. M., and J. C. Paton. 1996. 'Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 64: 5255-62.
- Bewley, M. A., H. M. Marriott, C. Tulone, S. E. Francis, T. J. Mitchell, R. C. Read, B. Chain, G. Kroemer, M. K. Whyte, and D. H. Dockrell. 2011. 'A cardinal role for cathepsin d in co-ordinating the host-mediated apoptosis of macrophages and killing of pneumococci', *PLoS Pathog*, 7: e1001262.
- Birgisdottir, A. B., T. Lamark, and T. Johansen. 2013. 'The LIR motif - crucial for selective autophagy', *J Cell Sci*, 126: 3237-47.

- Blijleven, J. S., S. Boonstra, P. R. Onck, E. van der Giessen, and A. M. van Oijen. 2016. 'Mechanisms of influenza viral membrane fusion', *Semin Cell Dev Biol*, 60: 78-88.
- Blue, C. E., and T. J. Mitchell. 2003. 'Contribution of a response regulator to the virulence of *Streptococcus pneumoniae* is strain dependent', *Infect Immun*, 71: 4405-13.
- Bogaert, D., R. De Groot, and P. W. Hermans. 2004. '*Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease', *Lancet Infect Dis*, 4: 144-54.
- Bosch, A. A., G. Biesbroek, K. Trzcinski, E. A. Sanders, and D. Bogaert. 2013. 'Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract', *PLoS Pathog*, 9: e1003057.
- Bourret, T. J., L. Liu, J. A. Shaw, M. Husain, and A. Vazquez-Torres. 2017. 'Magnesium homeostasis protects *Salmonella* against nitrooxidative stress', *Sci Rep*, 7: 15083.
- Brittan, J. L., T. J. Buckeridge, A. Finn, A. Kadioglu, and H. F. Jenkinson. 2012. 'Pneumococcal neuraminidase A: an essential upper airway colonization factor for *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Oral Microbiol*, 27: 270-83.
- Brown, Jeremy editor, Sven editor Hammerschmidt, and Carlos editor Orihuela. *Streptococcus pneumoniae : molecular mechanisms of host-pathogen interactions*.
- Burnaugh, A. M., L. J. Frantz, and S. J. King. 2008. 'Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases', *J Bacteriol*, 190: 221-30.
- Carayol, N., and G. Tran Van Nhieu. 2013. 'Tips and tricks about *Shigella* invasion of epithelial cells', *Curr Opin Microbiol*, 16: 32-7.
- Carvalho, S. M., T. G. Kloosterman, O. P. Kuipers, and A. R. Neves. 2011. 'CcpA ensures optimal metabolic fitness of *Streptococcus pneumoniae*', *PLoS One*, 6: e26707.
- Cassone, M., A. L. Gagne, L. A. Spruce, S. H. Seeholzer, and M. E. Sebert. 2012. 'The HtrA protease from *Streptococcus pneumoniae* digests both denatured proteins and the competence-stimulating peptide', *J Biol Chem*, 287: 38449-59.
- Caymaris, S., H. J. Bootsma, B. Martin, P. W. Hermans, M. Prudhomme, and J. P. Claverys. 2010. 'The global nutritional regulator CodY is an essential protein in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Microbiol*, 78: 344-60.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2017. 'Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) Report Emerging Infections Program Network *Streptococcus pneumoniae*, 2017'. <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/spneu17.pdf>.
- Chaipan, C., D. Kobasa, S. Bertram, I. Glowacka, I. Steffen, T. S. Tsegaye, M. Takeda, T. H. Bugge, S. Kim, Y. Park, A. Marzi, and S. Pohlmann. 2009. 'Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin', *J Virol*, 83: 3200-11.
- Chastanet, A., M. Prudhomme, J. P. Claverys, and T. Msadek. 2001. 'Regulation of *Streptococcus pneumoniae* clp genes and their role in competence development and stress survival', *J Bacteriol*, 183: 7295-307.
- Choi, I. H., J. H. Shim, S. W. Kim, S. N. Kim, S. N. Pyo, and D. K. Rhee. 1999. 'Limited stress response in *Streptococcus pneumoniae*', *Microbiol Immunol*, 43: 807-12.
- Claverys, J. P., and L. S. Havarstein. 2002. 'Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*', *Front Biosci*, 7: d1798-814.
- Claverys, J. P., M. Prudhomme, and B. Martin. 2006. 'Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria', *Annu Rev Microbiol*, 60: 451-75.
- Clemens, D. L. 1996. 'Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome', *Trends Microbiol*, 4: 113-8.
- Cortes, P. R., G. E. Pinas, M. B. Cian, N. Yandar, and J. Echenique. 2015. 'Stress-triggered signaling affecting survival or suicide of *Streptococcus pneumoniae*', *Int J Med Microbiol*, 305: 157-69.
- Cossart, P., and A. Helenius. 2014. 'Endocytosis of viruses and bacteria', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.

- Cotter, P. D., and C. Hill. 2003. 'Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH', *Microbiol Mol Biol Rev*, 67: 429-53, table of contents.
- Croucher, N. J., J. J. Campo, T. Q. Le, X. Liang, S. D. Bentley, W. P. Hanage, and M. Lipsitch. 2017. 'Diverse evolutionary patterns of pneumococcal antigens identified by pangenome-wide immunological screening', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E357-E66.
- Cundell, D. R., J. N. Weiser, J. Shen, A. Young, and E. I. Tuomanen. 1995. 'Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 63: 757-61.
- Dawood, F. S., A. D. Iuliano, C. Reed, M. I. Meltzer, D. K. Shay, P. Y. Cheng, D. Bandaranayake, R. F. Breiman, W. A. Brooks, P. Buchy, D. R. Feikin, K. B. Fowler, A. Gordon, N. T. Hien, P. Horby, Q. S. Huang, M. A. Katz, A. Krishnan, R. Lal, J. M. Montgomery, K. Molbak, R. Pebody, A. M. Presanis, H. Razuri, A. Steens, Y. O. Tinoco, J. Wallinga, H. Yu, S. Vong, J. Bresee, and M. A. Widdowson. 2012. 'Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study', *Lancet Infect Dis*, 12: 687-95.
- Dias, A., D. Bouvier, T. Crepin, A. A. McCarthy, D. J. Hart, F. Baudin, S. Cusack, and R. W. Ruigrok. 2009. 'The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit', *Nature*, 458: 914-8.
- Donkor, E. S. 2013. 'Understanding the pneumococcus: transmission and evolution', *Front Cell Infect Microbiol*, 3: 7.
- Dou, D., R. Revol, H. Ostbye, H. Wang, and R. Daniels. 2018. 'Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement', *Front Immunol*, 9: 1581.
- Dreux, N., M. del Mar Cendra, S. Massier, A. Darfeuille-Michaud, N. Barnich, and E. Torrents. 2015. 'Ribonucleotide reductase NrdR as a novel regulator for motility and chemotaxis during adherent-invasive *Escherichia coli* infection', *Infect Immun*, 83: 1305-17.
- Dugan, V. G., R. Chen, D. J. Spiro, N. Sengamalay, J. Zaborsky, E. Ghedin, J. Nolting, D. E. Swayne, J. A. Runstadler, G. M. Happ, D. A. Senne, R. Wang, R. D. Slemons, E. C. Holmes, and J. K. Taubenberger. 2008. 'The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds', *PLoS Pathog*, 4: e1000076.
- Echenique, J., A. Kadioglu, S. Romao, P. W. Andrew, and M. C. Trombe. 2004. 'Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 72: 2434-7.
- Echenique, J. R., S. Chapuy-Regaud, and M. C. Trombe. 2000. 'Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of ciaRH and comCDE', *Mol Microbiol*, 36: 688-96.
- Echenique, J. R., and M. C. Trombe. 2001. 'Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB', *J Bacteriol*, 183: 4599-608.
- Echlin, H., M. W. Frank, A. Iverson, T. C. Chang, M. D. Johnson, C. O. Rock, and J. W. Rosch. 2016. 'Pyruvate Oxidase as a Critical Link between Metabolism and Capsule Biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*', *PLoS Pathog*, 12: e1005951.
- Eierhoff, T., E. R. Hrinčius, U. Rescher, S. Ludwig, and C. Ehrhardt. 2010. 'The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells', *PLoS Pathog*, 6: e1001099.
- Eijkelkamp, B. A., J. R. Morey, M. P. Ween, C. L. Ong, A. G. McEwan, J. C. Paton, and C. A. McDevitt. 2014. 'Extracellular zinc competitively inhibits manganese uptake and compromises oxidative stress management in *Streptococcus pneumoniae*', *PLoS One*, 9: e89427.
- Ercoli, G., V. E. Fernandes, W. Y. Chung, J. J. Wanford, S. Thomson, C. D. Bayliss, K. Straatman, P. R. Crocker, A. Dennison, L. Martinez-Pomares, P. W. Andrew, E. R. Moxon, and M. R. Oggioni. 2018. 'Intracellular replication of *Streptococcus pneumoniae* inside splenic macrophages serves as a reservoir for septicaemia', *Nat Microbiol*, 3: 600-10.

- Fabri, M., S. E. Realegeno, E. K. Jo, and R. L. Modlin. 2011. 'Role of autophagy in the host response to microbial infection and potential for therapy', *Curr Opin Immunol*, 23: 65-70.
- Fernebro, J., I. Andersson, J. Sublett, E. Morfeldt, R. Novak, E. Tuomanen, S. Normark, and B. H. Normark. 2004. 'Capsular expression in *Streptococcus pneumoniae* negatively affects spontaneous and antibiotic-induced lysis and contributes to antibiotic tolerance', *J Infect Dis*, 189: 328-38.
- Fiedler, M. A., K. Wernke-Dollries, and J. M. Stark. 1995. 'Respiratory syncytial virus increases IL-8 gene expression and protein release in A549 cells', *Am J Physiol*, 269: L865-72.
- Figueira, R., and D. W. Holden. 2012. 'Functions of the Salmonella pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors', *Microbiology*, 158: 1147-61.
- Filipe, S. R., M. G. Pinho, and A. Tomasz. 2000. 'Characterization of the murMN operon involved in the synthesis of branched peptidoglycan peptides in *Streptococcus pneumoniae*', *J Biol Chem*, 275: 27768-74.
- Filipe, S. R., E. Severina, and A. Tomasz. 2002. 'The murMN operon: a functional link between antibiotic resistance and antibiotic tolerance in *Streptococcus pneumoniae*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 1550-5.
- Filipe, S. R., and A. Tomasz. 2000. 'Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 4891-6.
- Flanagan, R. S., R. C. Kuiack, M. J. McGavin, and D. E. Heinrichs. 2018. 'Staphylococcus aureus Uses the GraXRS Regulatory System To Sense and Adapt to the Acidified Phagolysosome in Macrophages', *MBio*, 9.
- Frolet, C., M. Beniazza, L. Roux, B. Gallet, M. Noirclerc-Savoie, T. Vernet, and A. M. Di Guilmi. 2010. 'New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins', *BMC Microbiol*, 10: 190.
- Gagliardi, S., M. Rees, and C. Farina. 1999. 'Chemistry and structure activity relationships of bafilomycin A1, a potent and selective inhibitor of the vacuolar H⁺-ATPase', *Curr Med Chem*, 6: 1197-212.
- Gannage, M., D. Dormann, R. Albrecht, J. Dengjel, T. Torossi, P. C. Ramer, M. Lee, T. Strowig, F. Arrey, G. Conenello, M. Pypaert, J. Andersen, A. Garcia-Sastre, and C. Munz. 2009. 'Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes', *Cell Host Microbe*, 6: 367-80.
- Gennaris, A., and J. F. Collet. 2013. 'The 'captain of the men of death', *Streptococcus pneumoniae*, fights oxidative stress outside the 'city wall'', *EMBO Mol Med*, 5: 1798-800.
- Geno, K. A., G. L. Gilbert, J. Y. Song, I. C. Skovsted, K. P. Klugman, C. Jones, H. B. Konradsen, and M. H. Nahm. 2015. 'Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future', *Clin Microbiol Rev*, 28: 871-99.
- Gerber, P., C. G. Loosli, and D. Hambre. 1955. 'Antigenic variants of influenza A virus, PR8 strain. I. Their development during serial passage in the lungs of partially immune mice', *J Exp Med*, 101: 627-38.
- Giefing, C., A. L. Meinke, M. Hanner, T. Henics, M. D. Bui, D. Gelbmann, U. Lundberg, B. M. Senn, M. Schunn, A. Habel, B. Henriques-Normark, A. Ortqvist, M. Kalin, A. von Gabain, and E. Nagy. 2008. 'Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies', *J Exp Med*, 205: 117-31.
- Glanville, D. G., L. Han, A. F. Maule, A. Woodacre, D. Thanki, I. T. Abdullah, J. A. Morrissey, T. B. Clarke, H. Yesilkaya, N. R. Silvaggi, and A. T. Ulijasz. 2018. 'RitR is an archetype for a novel family of redox sensors in the streptococci that has evolved from two-component response regulators and is required for pneumococcal colonization', *PLoS Pathog*, 14: e1007052.
- Glomski, I. J., M. M. Gedde, A. W. Tsang, J. A. Swanson, and D. A. Portnoy. 2002. 'The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells', *J Cell Biol*, 156: 1029-38.
- Gomes, L. C., and I. Dikic. 2014. 'Autophagy in antimicrobial immunity', *Mol Cell*, 54: 224-33.

- Gomez-Mejia, A., G. Gamez, and S. Hammerschmidt. 2018. 'Streptococcus pneumoniae two-component regulatory systems: The interplay of the pneumococcus with its environment', *Int J Med Microbiol*, 308: 722-37.
- Grangeasse, C. 2016. 'Rewiring the Pneumococcal Cell Cycle with Serine/Threonine- and Tyrosine-kinases', *Trends Microbiol*, 24: 713-24.
- Grasso, D., F. J. Renna, and M. I. Vaccaro. 2018. 'Initial Steps in Mammalian Autophagosome Biogenesis', *Front Cell Dev Biol*, 6: 146.
- Gray, Barry M., and Daniel M. Musher. 2008. 'The History of Pneumococcal Disease.' in George R. Siber, Keith P. Klugman and Helena P. Mäkelä (eds.), *Pneumococcal Vaccines: The impact of conjugated vaccines* (ASM Press: Wasshington DC, USA).
- Griffith, F. 1928. 'The Significance of Pneumococcal Types', *J Hyg (Lond)*, 27: 113-59.
- Groisman, E. A. 2016. 'Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems', *Annu Rev Microbiol*, 70: 103-24.
- Guiral, S., T. J. Mitchell, B. Martin, and J. P. Claverys. 2005. 'Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 8710-5.
- Haas, W., D. Kaushal, J. Sublett, C. Obert, and E. I. Tuomanen. 2005. 'Vancomycin stress response in a sensitive and a tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae*', *J Bacteriol*, 187: 8205-10.
- Haas, W., J. Sublett, D. Kaushal, and E. I. Tuomanen. 2004. 'Revising the role of the pneumococcal vex-vncRS locus in vancomycin tolerance', *J Bacteriol*, 186: 8463-71.
- Hament, J. M., P. C. Aerts, A. Fleer, H. Van Dijk, T. Harmsen, J. L. Kimpen, and T. F. Wolfs. 2004. 'Enhanced adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human epithelial cells infected with respiratory syncytial virus', *Pediatr Res*, 55: 972-8.
- Harapanahalli, A. K., J. A. Younes, E. Allan, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher. 2015. 'Chemical Signals and Mechanosensing in Bacterial Responses to Their Environment', *PLoS Pathog*, 11: e1005057.
- Hartel, T., E. Eylert, C. Schulz, L. Petruschka, P. Gierok, S. Grubmuller, M. Lalk, W. Eisenreich, and S. Hammerschmidt. 2012. 'Characterization of central carbon metabolism of *Streptococcus pneumoniae* by isotopologue profiling', *J Biol Chem*, 287: 4260-74.
- Hava, D. L., and A. Camilli. 2002. 'Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors', *Mol Microbiol*, 45: 1389-406.
- Hay, A. J., A. J. Wolstenholme, J. J. Skehel, and M. H. Smith. 1985. 'The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine', *EMBO J*, 4: 3021-4.
- Hendriksen, W. T., N. Silva, H. J. Bootsma, C. E. Blue, G. K. Paterson, A. R. Kerr, A. de Jong, O. P. Kuipers, P. W. Hermans, and T. J. Mitchell. 2007. 'Regulation of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* by response regulator 09 is strain dependent', *J Bacteriol*, 189: 1382-9.
- Holmes, A. R., R. McNab, K. W. Millsap, M. Rohde, S. Hammerschmidt, J. L. Mawdsley, and H. F. Jenkinson. 2001. 'The pavA gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence', *Mol Microbiol*, 41: 1395-408.
- Honsa, E. S., M. D. Johnson, and J. W. Rosch. 2013. 'The roles of transition metals in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*', *Front Cell Infect Microbiol*, 3: 92.
- Hoyle, L., and R. W. Fairbrother. 1937. 'Isolation of Influenza Virus: The Manchester Epidemic', *Br Med J*, 1: 655-7.
- Hua, C. Z., A. Howard, R. Malley, and Y. J. Lu. 2014. 'Effect of nonheme iron-containing ferritin Dpr in the stress response and virulence of pneumococci', *Infect Immun*, 82: 3939-47.
- Hutagalung, A. H., and P. J. Novick. 2011. 'Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology', *Physiol Rev*, 91: 119-49.

- Hyams, C., E. Camberlein, J. M. Cohen, K. Bax, and J. S. Brown. 2010. 'The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms', *Infect Immun*, 78: 704-15.
- Iuchi, H., J. Otori, T. Kyutoku, K. Ito, and Y. Kurono. 2019. 'Role of phosphorylcholine in *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable Haemophilus influenzae adherence to epithelial cells', *Auris Nasus Larynx*, 46: 513-19.
- Iverson, A. R., K. L. Boyd, J. L. McAuley, L. R. Plano, M. E. Hart, and J. A. McCullers. 2011. 'Influenza virus primes mice for pneumonia from Staphylococcus aureus', *J Infect Dis*, 203: 880-8.
- Jacob-Dubuisson, F., A. Mechaly, J. M. Betton, and R. Antoine. 2018. 'Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems', *Nat Rev Microbiol*, 16: 585-93.
- Jacob, C., A. Kriznik, S. Boschi-Muller, and G. Branlant. 2011. 'Thioredoxin 2 from Escherichia coli is not involved in vivo in the recycling process of methionine sulfoxide reductase activities', *FEBS Lett*, 585: 1905-9.
- James, K. L., A. B. Mogen, J. N. Brandwein, S. S. Orsini, M. J. Ridder, M. A. Markiewicz, J. L. Bose, and K. C. Rice. 2019. 'Interplay of Nitric Oxide Synthase (NOS) and SrrAB in Modulation of Staphylococcus aureus Metabolism and Virulence', *Infect Immun*, 87.
- Jing, X., C. Ma, Y. Ohigashi, F. A. Oliveira, T. S. Jardetzky, L. H. Pinto, and R. A. Lamb. 2008. 'Functional studies indicate amantadine binds to the pore of the influenza A virus M2 proton-selective ion channel', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 10967-72.
- Jochems, S. P., F. Marcon, B. F. Carniel, M. Holloway, E. Mitsi, E. Smith, J. F. Gritzfeld, C. Solorzano, J. Reine, S. Pojar, E. Nikolaou, E. L. German, A. Hyder-Wright, H. Hill, C. Hales, W. A. A. de Steenhuisen Pijters, D. Bogaert, H. Adler, S. Zaidi, V. Connor, S. B. Gordon, J. Rylance, H. I. Nakaya, and D. M. Ferreira. 2018. 'Inflammation induced by influenza virus impairs human innate immune control of pneumococcus', *Nat Immunol*, 19: 1299-308.
- Johnston, J. W., L. E. Myers, M. M. Ochs, W. H. Benjamin, Jr., D. E. Briles, and S. K. Hollingshead. 2004. 'Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide', *Infect Immun*, 72: 5858-67.
- Jomaa, M., J. Yuste, J. C. Paton, C. Jones, G. Dougan, and J. S. Brown. 2005. 'Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 73: 6852-9.
- Jung, C. H., S. H. Ro, J. Cao, N. M. Otto, and D. H. Kim. 2010. 'mTOR regulation of autophagy', *FEBS Lett*, 584: 1287-95.
- Jung, K. I., C. W. Pyo, and S. Y. Choi. 2018. 'Influenza A virus-induced autophagy contributes to enhancement of virus infectivity by SOD1 downregulation in alveolar epithelial cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 498: 960-66.
- Kadioglu, A., J. Echenique, S. Manco, M. C. Trombe, and P. W. Andrew. 2003. 'The MicAB two-component signaling system is involved in virulence of *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 71: 6676-9.
- Kadioglu, A., J. N. Weiser, J. C. Paton, and P. W. Andrew. 2008. 'The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease', *Nat Rev Microbiol*, 6: 288-301.
- Kajfasz, J. K., I. Rivera-Ramos, J. Abranches, A. R. Martinez, P. L. Rosalen, A. M. Derr, R. G. Quivey, and J. A. Lemos. 2010. 'Two Spx proteins modulate stress tolerance, survival, and virulence in *Streptococcus mutans*', *J Bacteriol*, 192: 2546-56.
- Kenney, L. J. 2019. 'The role of acid stress in Salmonella pathogenesis', *Curr Opin Microbiol*, 47: 45-51.
- Khandia, R., M. Dadar, A. Munjal, K. Dhama, K. Karthik, R. Tiwari, M. I. Yatoo, H. M. N. Iqbal, K. P. Singh, S. K. Joshi, and W. Chaicumpa. 2019. 'A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy', *Cells*, 8.

- Khomich, O. A., S. N. Kochetkov, B. Bartosch, and A. V. Ivanov. 2018. 'Redox Biology of Respiratory Viral Infections', *Viruses*, 10.
- Kim, J., M. Kundu, B. Viollet, and K. L. Guan. 2011. 'AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1', *Nat Cell Biol*, 13: 132-41.
- Kim, L., L. McGee, S. Tomczyk, and B. Beall. 2016. 'Biological and Epidemiological Features of Antibiotic-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Pre- and Post-Conjugate Vaccine Eras: a United States Perspective', *Clin Microbiol Rev*, 29: 525-52.
- Kim, S. N., S. W. Kim, S. N. Pyo, and D. K. Rhee. 2001. 'Molecular cloning and characterization of groESL operon in *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Cells*, 11: 360-8.
- Kimmey, J. M., and C. L. Stallings. 2016. 'Bacterial Pathogens versus Autophagy: Implications for Therapeutic Interventions', *Trends Mol Med*, 22: 1060-76.
- King, Q. O., B. Lei, and A. G. Harmsen. 2009. 'Pneumococcal surface protein A contributes to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection after influenza virus infection', *J Infect Dis*, 200: 537-45.
- King, S. J., K. R. Hippe, and J. N. Weiser. 2006. 'Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Microbiol*, 59: 961-74.
- Kirkin, V., D. G. McEwan, I. Novak, and I. Dikic. 2009. 'A role for ubiquitin in selective autophagy', *Mol Cell*, 34: 259-69.
- Kjos, M., R. Aprianto, V. E. Fernandes, P. W. Andrew, J. A. van Strijp, R. Nijland, and J. W. Veening. 2015. 'Bright fluorescent *Streptococcus pneumoniae* for live-cell imaging of host-pathogen interactions', *J Bacteriol*, 197: 807-18.
- Kjos, M., E. Miller, J. Slager, F. B. Lake, O. Gericke, I. S. Roberts, D. E. Rozen, and J. W. Veening. 2016. 'Expression of *Streptococcus pneumoniae* Bacteriocins Is Induced by Antibiotics via Regulatory Interplay with the Competence System', *PLoS Pathog*, 12: e1005422.
- Kloosterman, T. G., R. M. Witwicki, M. M. van der Kooi-Pol, J. J. Bijlsma, and O. P. Kuipers. 2008. 'Opposite effects of Mn²⁺ and Zn²⁺ on PsaR-mediated expression of the virulence genes pcpA, prtA, and psaBCA of *Streptococcus pneumoniae*', *J Bacteriol*, 190: 5382-93.
- Komaravelli, N., and A. Casola. 2014. 'Respiratory Viral Infections and Subversion of Cellular Antioxidant Defenses', *J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics*, 5.
- Kowalko, J. E., and M. E. Sebert. 2008. 'The *Streptococcus pneumoniae* competence regulatory system influences respiratory tract colonization', *Infect Immun*, 76: 3131-40.
- Krammer, F., G. J. D. Smith, R. A. M. Fouchier, M. Peiris, K. Kedzierska, P. C. Doherty, P. Palese, M. L. Shaw, J. Treanor, R. G. Webster, and A. Garcia-Sastre. 2018. 'Influenza', *Nat Rev Dis Primers*, 4: 3.
- Kuma, A., M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhisa, and N. Mizushima. 2004. 'The role of autophagy during the early neonatal starvation period', *Nature*, 432: 1032-6.
- Kwon, D. H., and H. K. Song. 2018. 'A Structural View of Xenophagy, a Battle between Host and Microbes', *Mol Cells*, 41: 27-34.
- Kwon, H. Y., S. W. Kim, M. H. Choi, A. D. Ogunniyi, J. C. Paton, S. H. Park, S. N. Pyo, and D. K. Rhee. 2003. 'Effect of heat shock and mutations in ClpL and ClpP on virulence gene expression in *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 71: 3757-65.
- Ladhani, S. N., S. Collins, A. Djennad, C. L. Sheppard, R. Borrow, N. K. Fry, N. J. Andrews, E. Miller, and M. E. Ramsay. 2018. 'Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000-17: a prospective national observational cohort study', *Lancet Infect Dis*, 18: 441-51.
- Lange, R., C. Wagner, A. de Saizieu, N. Flint, J. Molnos, M. Stieger, P. Caspers, M. Kamber, W. Keck, and K. E. Amrein. 1999. 'Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*', *Gene*, 237: 223-34.

- Laub, M. T., and M. Goulian. 2007. 'Specificity in two-component signal transduction pathways', *Annu Rev Genet*, 41: 121-45.
- Laux, A., A. Sexauer, D. Sivaselvarajah, A. Kaysen, and R. Bruckner. 2015. 'Control of competence by related non-coding csRNAs in *Streptococcus pneumoniae* R6', *Front Genet*, 6: 246.
- Lawrence, M. C., P. A. Pilling, V. C. Epa, A. M. Berry, A. D. Ogunniyi, and J. C. Paton. 1998. 'The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal-binding site and a novel structure for a putative ABC-type binding protein', *Structure*, 6: 1553-61.
- Lazarowitz, S. G., R. W. Compans, and P. W. Choppin. 1973. 'Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA', *Virology*, 52: 199-212.
- Lee, J. O., J. Y. Kim, D. K. Rhee, and S. Pyo. 2013. 'Streptococcus pneumoniae ClpP protease induces apoptosis via caspase-independent pathway in human neuroblastoma cells: cytoplasmic relocalization of p53', *Toxicon*, 70: 142-52.
- Lefevre, J. C., J. P. Claverys, and A. M. Sicard. 1979. 'Donor deoxyribonucleic acid length and marker effect in pneumococcal transformation', *J Bacteriol*, 138: 80-6.
- Len, A. C., D. W. Harty, and N. A. Jacques. 2004. 'Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance', *Microbiology*, 150: 1353-66.
- Levandowski, R. A., T. R. Gerrity, and C. S. Garrard. 1985. 'Modifications of lung clearance mechanisms by acute influenza A infection', *J Lab Clin Med*, 106: 428-32.
- Li, P., J. Shi, Q. He, Q. Hu, Y. Y. Wang, L. J. Zhang, W. T. Chan, and W. X. Chen. 2015. '*Streptococcus pneumoniae* induces autophagy through the inhibition of the PI3K-I/Akt/mTOR pathway and ROS hypergeneration in A549 cells', *PLoS One*, 10: e0122753.
- Li, Y. H., P. C. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch. 2001. 'Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms', *J Bacteriol*, 183: 897-908.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25: 402-8.
- Magill, T. P., and T. Francis. 1937. 'The Action of Immune Serum on Human Influenza Virus in Vitro', *J Exp Med*, 65: 861-72.
- Manzoor, R., M. Igarashi, and A. Takada. 2017. 'Influenza A Virus M2 Protein: Roles from Ingress to Egress', *Int J Mol Sci*, 18.
- Marra, A., J. Asundi, M. Bartilson, S. Lawson, F. Fang, J. Christine, C. Wiesner, D. Brigham, W. P. Schneider, and A. E. Hromockyj. 2002. 'Differential fluorescence induction analysis of *Streptococcus pneumoniae* identifies genes involved in pathogenesis', *Infect Immun*, 70: 1422-33.
- Marra, A., S. Lawson, J. S. Asundi, D. Brigham, and A. E. Hromockyj. 2002. 'In vivo characterization of the psa genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection', *Microbiology*, 148: 1483-91.
- Marriott, H. M., and D. H. Dockrell. 2006. '*Streptococcus pneumoniae*: the role of apoptosis in host defense and pathogenesis', *Int J Biochem Cell Biol*, 38: 1848-54.
- Martin, B., A. L. Soulet, N. Mirouze, M. Prudhomme, I. Mortier-Barriere, C. Granadel, M. F. Noirot-Gros, P. Noirot, P. Polard, and J. P. Claverys. 2013. 'ComE/ComE~P interplay dictates activation or extinction status of pneumococcal X-state (competence)', *Mol Microbiol*, 87: 394-411.
- Martin, J. E., J. P. Lisher, M. E. Winkler, and D. P. Giedroc. 2017. 'Perturbation of manganese metabolism disrupts cell division in *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Microbiol*, 104: 334-48.
- Mascher, T., M. Heintz, D. Zahner, M. Merai, and R. Hakenbeck. 2006. 'The CiaRH system of *Streptococcus pneumoniae* prevents lysis during stress induced by treatment with cell wall inhibitors and by mutations in pbp2x involved in beta-lactam resistance', *J Bacteriol*, 188: 1959-68.
- Maulucci, G., M. Chiarpotto, M. Papi, D. Samengo, G. Pani, and M. De Spirito. 2015. 'Quantitative analysis of autophagic flux by confocal pH-imaging of autophagic intermediates', *Autophagy*, 11: 1905-16.

- McAllister, L. J., H. J. Tseng, A. D. Ogunniyi, M. P. Jennings, A. G. McEwan, and J. C. Paton. 2004. 'Molecular analysis of the *psa* permease complex of *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Microbiol*, 53: 889-901.
- McCleary, W. R., and J. B. Stock. 1994. 'Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators', *J Biol Chem*, 269: 31567-72.
- McCluskey, J., J. Hinds, S. Husain, A. Witney, and T. J. Mitchell. 2004. 'A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Microbiol*, 51: 1661-75.
- McCullers, J. A. 2006. 'Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus', *Clin Microbiol Rev*, 19: 571-82.
- . 2014. 'The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung', *Nat Rev Microbiol*, 12: 252-62.
- McCullers, J. A., and K. C. Bartmess. 2003. 'Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*', *J Infect Dis*, 187: 1000-9.
- McCullers, J. A., A. R. Iverson, R. McKeon, and P. J. Murray. 2008. 'The platelet activating factor receptor is not required for exacerbation of bacterial pneumonia following influenza', *Scand J Infect Dis*, 40: 11-7.
- McCullers, J. A., and J. E. Rehg. 2002. 'Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor', *J Infect Dis*, 186: 341-50.
- McKessar, S. J., and R. Hakenbeck. 2007. 'The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6', *J Bacteriol*, 189: 1342-50.
- Metchnikoff, Eli. 1891. 'Études sur l'immunité, 4e memoire. L'immunité de cobayes vaccinés contre le *vibrio Metchnikowii*.', *Ann. Inst. Pasteur*, 5: 465-78.
- Mishra, A. K., S. M. Yabaji, R. K. Dubey, E. Dhamija, and K. K. Srivastava. 2017. 'Dual phosphorylation in response regulator protein PrrA is crucial for intracellular survival of mycobacteria consequent upon transcriptional activation', *Biochem J*, 474: 4119-36.
- Mitchell, A. M., and T. J. Mitchell. 2010. '*Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation', *Clin Microbiol Infect*, 16: 411-8.
- Mitchell, T. J., P. W. Andrew, F. K. Saunders, A. N. Smith, and G. J. Boulnois. 1991. 'Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein', *Mol Microbiol*, 5: 1883-8.
- Mohedano, M. L., K. Overweg, A. de la Fuente, M. Reuter, S. Altabe, F. Mulholland, D. de Mendoza, P. Lopez, and J. M. Wells. 2005. 'Evidence that the essential response regulator YycF in *Streptococcus pneumoniae* modulates expression of fatty acid biosynthesis genes and alters membrane composition', *J Bacteriol*, 187: 2357-67.
- Morris, D. E., D. W. Cleary, and S. C. Clarke. 2017. 'Secondary Bacterial Infections Associated with Influenza Pandemics', *Front Microbiol*, 8: 1041.
- Mortier-Barriere, I., A. de Saizieu, J. P. Claverys, and B. Martin. 1998. 'Competence-specific induction of *recA* is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Microbiol*, 27: 159-70.
- Motib, A. S., F. A. Y. Al-Bayati, I. Manzoor, S. Shafeeq, A. Kadam, O. P. Kuipers, N. L. Hiller, P. W. Andrew, and H. Yesilkaya. 2019. 'TprA/PhrA Quorum Sensing System Has a Major Effect on Pneumococcal Survival in Respiratory Tract and Blood, and Its Activity Is Controlled by CcpA and GlnR', *Front Cell Infect Microbiol*, 9: 326.
- Musher, Daniel M. 2009. '*Streptococcus pneumoniae*.' in Gerald L. Mandell, John E. Bennett and Raphael Dolin (eds.), *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Churchill Livingstone).

- Nayak, D. P., R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou, and S. Barman. 2009. 'Influenza virus morphogenesis and budding', *Virus Res*, 143: 147-61.
- Nelson, A. L., A. M. Roche, J. M. Gould, K. Chim, A. J. Ratner, and J. N. Weiser. 2007. 'Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance', *Infect Immun*, 75: 83-90.
- Nelson, M. I., and M. Worobey. 2018. 'Origins of the 1918 Pandemic: Revisiting the Swine "Mixing Vessel" Hypothesis', *Am J Epidemiol*, 187: 2498-502.
- Nguyen, C. T., N. T. Le, T. D. Tran, E. H. Kim, S. S. Park, T. T. Luong, K. T. Chung, S. Pyo, and D. K. Rhee. 2014. '*Streptococcus pneumoniae* ClpL modulates adherence to A549 human lung cells through Rap1/Rac1 activation', *Infect Immun*, 82: 3802-10.
- Nishida, Y., S. Arakawa, K. Fujitani, H. Yamaguchi, T. Mizuta, T. Kanaseki, M. Komatsu, K. Otsu, Y. Tsujimoto, and S. Shimizu. 2009. 'Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy', *Nature*, 461: 654-8.
- Novak, R., J. S. Braun, E. Charpentier, and E. Tuomanen. 1998. 'Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa', *Mol Microbiol*, 29: 1285-96.
- Ogawa, M., R. Matsuda, N. Takada, M. Tomokiyo, S. Yamamoto, S. Shizukushi, T. Yamaji, Y. Yoshikawa, M. Yoshida, I. Tanida, M. Koike, M. Murai, H. Morita, H. Takeyama, A. Ryo, J. L. Guan, M. Yamamoto, J. I. Inoue, T. Yanagawa, M. Fukuda, H. Kawabe, and M. Ohnishi. 2018. 'Molecular mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*-targeted autophagy via pneumolysin, Golgi-resident Rab41, and Nedd4-1-mediated K63-linked ubiquitination', *Cell Microbiol*, 20: e12846.
- Ogawa, M., N. Takada, S. Shizukuishi, M. Tomokiyo, B. Chang, M. Yoshida, S. Kakuta, I. Tanida, A. Ryo, J. L. Guan, H. Takeyama, and M. Ohnishi. 2020. '*Streptococcus pneumoniae* triggers hierarchical autophagy through reprogramming of LAPosome-like vesicles via NDP52-delocalization', *Commun Biol*, 3: 25.
- Oggioni, M. R., C. Trappetti, A. Kadioglu, M. Cassone, F. Iannelli, S. Ricci, P. W. Andrew, and G. Pozzi. 2006. 'Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis', *Mol Microbiol*, 61: 1196-210.
- Ogunniyi, A. D., L. K. Mahdi, M. P. Jennings, A. G. McEwan, C. A. McDevitt, M. B. Van der Hoek, C. J. Bagley, P. Hoffmann, K. A. Gould, and J. C. Paton. 2010. 'Central role of manganese in regulation of stress responses, physiology, and metabolism in *Streptococcus pneumoniae*', *J Bacteriol*, 192: 4489-97.
- Organization, World Health. 2014. 'Global immunization data', World Health Organization. http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/global_immunization_data.pdf?ua=1.
- Orihuela, C. J., J. N. Radin, J. E. Sublett, G. Gao, D. Kaushal, and E. I. Tuomanen. 2004. 'Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease', *Infect Immun*, 72: 5582-96.
- Paget, C., and F. Trottein. 2019. 'Mechanisms of Bacterial Superinfection Post-influenza: A Role for Unconventional T Cells', *Front Immunol*, 10: 336.
- Pardo-Este, C., A. A. Hidalgo, C. Aguirre, A. Inostroza, A. C. Briones, C. E. Cabezas, J. Castro-Severyn, J. A. Fuentes, C. M. Opazo, C. A. Riedel, C. Otero, R. Pacheco, M. A. Valvano, and C. P. Saavedra. 2019. 'Correction: The ArcAB two-component regulatory system promotes resistance to reactive oxygen species and systemic infection by *Salmonella Typhimurium*', *PLoS One*, 14: e0214634.
- Park, S. S., H. Y. Kwon, T. D. Tran, M. H. Choi, S. H. Jung, S. Lee, D. E. Briles, and D. K. Rhee. 2015. 'ClpL is a chaperone without auxiliary factors', *FEBS J*, 282: 1352-67.
- Pasqua, M., M. Grossi, S. Scinicariello, L. Aussel, F. Barras, B. Colonna, and G. Prosseda. 2019. 'The MFS efflux pump EmrKY contributes to the survival of *Shigella* within macrophages', *Sci Rep*, 9: 2906.
- Paterson, G. K., C. E. Blue, and T. J. Mitchell. 2006. 'Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*', *J Med Microbiol*, 55: 355-63.

- Paul, M., R. M. Thushara, S. Jagadish, U. I. Zakai, R. West, K. Kemparaju, and K. S. Girish. 2017. 'Novel sila-amide derivatives of N-acetylcysteine protects platelets from oxidative stress-induced apoptosis', *J Thromb Thrombolysis*, 43: 209-16.
- Perez, A. J., Y. Cesbron, S. L. Shaw, J. Bazan Villicana, H. T. Tsui, M. J. Boersma, Z. A. Ye, Y. Tovpeko, C. Dekker, S. Holden, and M. E. Winkler. 2019. 'Movement dynamics of divisome proteins and PBP2x:FtsW in cells of *Streptococcus pneumoniae*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 3211-20.
- Pericone, C. D., K. Overweg, P. W. Hermans, and J. N. Weiser. 2000. 'Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract', *Infect Immun*, 68: 3990-7.
- Pericone, C. D., S. Park, J. A. Imlay, and J. N. Weiser. 2003. 'Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction', *J Bacteriol*, 185: 6815-25.
- Perot, B. P., J. Boussier, N. Yatim, J. S. Rossman, M. A. Ingersoll, and M. L. Albert. 2018. 'Autophagy diminishes the early interferon-beta response to influenza A virus resulting in differential expression of interferon-stimulated genes', *Cell Death Dis*, 9: 539.
- Peterson, S. N., C. K. Sung, R. Cline, B. V. Desai, E. C. Snesrud, P. Luo, J. Walling, H. Li, M. Mintz, G. Tsegaye, P. C. Burr, Y. Do, S. Ahn, J. Gilbert, R. D. Fleischmann, and D. A. Morrison. 2004. 'Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays', *Mol Microbiol*, 51: 1051-70.
- Pinas, G. E., P. R. Cortes, A. G. Orio, and J. Echenique. 2008. 'Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*', *Microbiology*, 154: 1300-8.
- Pinas, G. E., N. M. Reinoso-Vizcaino, N. Y. Yandar Barahona, P. R. Cortes, R. Duran, C. Badapanda, A. Rathore, D. R. Bichara, M. B. Cian, N. B. Olivero, D. R. Perez, and J. Echenique. 2018. 'Crosstalk between the serine/threonine kinase StkP and the response regulator ComE controls the stress response and intracellular survival of *Streptococcus pneumoniae*', *PLoS Pathog*, 14: e1007118.
- Pittet, L. A., L. Hall-Stoodley, M. R. Rutkowski, and A. G. Harmsen. 2010. 'Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42: 450-60.
- Poon, L. L., D. C. Pritlove, E. Fodor, and G. G. Brownlee. 1999. 'Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template', *J Virol*, 73: 3473-6.
- Pracht, D., C. Elm, J. Gerber, S. Bergmann, M. Rohde, M. Seiler, K. S. Kim, H. F. Jenkinson, R. Nau, and S. Hammerschmidt. 2005. 'PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation', *Infect Immun*, 73: 2680-9.
- Pyo, C. W., N. Shin, K. I. Jung, J. H. Choi, and S. Y. Choi. 2014. 'Alteration of copper-zinc superoxide dismutase 1 expression by influenza A virus is correlated with virus replication', *Biochem Biophys Res Commun*, 450: 711-6.
- Radin, J. N., C. J. Orihuela, G. Murti, C. Guglielmo, P. J. Murray, and E. I. Tuomanen. 2005. 'beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 73: 7827-35.
- Rai, P., M. Parrish, I. J. Tay, N. Li, S. Ackerman, F. He, J. Kwang, V. T. Chow, and B. P. Engelward. 2015. 'Streptococcus pneumoniae secretes hydrogen peroxide leading to DNA damage and apoptosis in lung cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E3421-30.
- Rajam, G., J. M. Anderton, G. M. Carlone, J. S. Sampson, and E. W. Ades. 2008. 'Pneumococcal surface adhesin A (PsaA): a review', *Crit Rev Microbiol*, 34: 131-42.
- Ramos-Sevillano, E., G. Ercoli, and J. S. Brown. 2019. 'Mechanisms of Naturally Acquired Immunity to *Streptococcus pneumoniae*', *Front Immunol*, 10: 358.

- Ramos-Sevillano, E., M. Moscoso, P. Garcia, E. Garcia, and J. Yuste. 2011. 'Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*', *PLoS One*, 6: e23626.
- Regev-Yochay, G., K. Trzcinski, C. M. Thompson, M. Lipsitch, and R. Malley. 2007. 'SpxB is a suicide gene of *Streptococcus pneumoniae* and confers a selective advantage in an in vivo competitive colonization model', *J Bacteriol*, 189: 6532-9.
- Ren, Y., C. Li, L. Feng, W. Pan, L. Li, Q. Wang, J. Li, N. Li, L. Han, X. Zheng, X. Niu, C. Sun, and L. Chen. 2016. 'Proton Channel Activity of Influenza A Virus Matrix Protein 2 Contributes to Autophagy Arrest', *J Virol*, 90: 591-8.
- Rosch, J. W., B. Mann, J. Thornton, J. Sublett, and E. Tuomanen. 2008. 'Convergence of regulatory networks on the pilus locus of *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 76: 3187-96.
- Rosenow, C., P. Ryan, J. N. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortqvist, and H. R. Masure. 1997. 'Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Microbiol*, 25: 819-29.
- Rowe, H. M., V. A. Meliopoulos, A. Iverson, P. Bomme, S. Schultz-Cherry, and J. W. Rosch. 2019. 'Direct interactions with influenza promote bacterial adherence during respiratory infections', *Nat Microbiol*, 4: 1328-36.
- Saskova, L., L. Novakova, M. Basler, and P. Branny. 2007. 'Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*', *J Bacteriol*, 189: 4168-79.
- Schaaf, M. B., T. G. Keulers, M. A. Vooijs, and K. M. Rouschop. 2016. 'LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions', *FASEB J*, 30: 3961-78.
- Schmid, D., and C. Munz. 2007. 'Innate and adaptive immunity through autophagy', *Immunity*, 27: 11-21.
- Schulze, R. J., A. Sathyanarayan, and D. G. Mashek. 2017. 'Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy', *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1862: 1178-87.
- Shirey, K. A., D. J. Perkins, W. Lai, W. Zhang, L. R. Fernando, F. Gusovsky, J. C. G. Blanco, and S. N. Vogel. 2019. 'Influenza "Trains" the Host for Enhanced Susceptibility to Secondary Bacterial Infection', *MBio*, 10.
- Shiri, T., N. D. McCarthy, and S. Petrou. 2019. 'The impact of childhood pneumococcal vaccination on hospital admissions in England: a whole population observational study', *BMC Infect Dis*, 19: 510.
- Shope, R. E. 1931. 'Swine Influenza : Iii. Filtration Experiments and Etiology', *J Exp Med*, 54: 373-85.
- Short, K. R., M. N. Habets, P. W. Hermans, and D. A. Diavatopoulos. 2012. 'Interactions between *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus: a mutually beneficial relationship?', *Future Microbiol*, 7: 609-24.
- Shtyrya, Y. A., L. V. Mochalova, and N. V. Bovin. 2009. 'Influenza virus neuraminidase: structure and function', *Acta Naturae*, 1: 26-32.
- Smith, A. M., F. R. Adler, R. M. Ribeiro, R. N. Gutenkunst, J. L. McAuley, J. A. McCullers, and A. S. Perelson. 2013. 'Kinetics of coinfection with influenza A virus and *Streptococcus pneumoniae*', *PLoS Pathog*, 9: e1003238.
- Smith, A. M., and J. A. McCullers. 2014. 'Secondary bacterial infections in influenza virus infection pathogenesis', *Curr Top Microbiol Immunol*, 385: 327-56.
- Smith, S. M., and J. G. Gums. 2010. 'Antivirals for influenza: strategies for use in pediatrics', *Paediatr Drugs*, 12: 285-99.
- Song, X. M., W. Connor, K. Hokamp, L. A. Babiuk, and A. A. Potter. 2009. 'The growth phase-dependent regulation of the pilus locus genes by two-component system TCS08 in *Streptococcus pneumoniae*', *Microb Pathog*, 46: 28-35.

- Standish, A. J., U. H. Stroehler, and J. C. Paton. 2005. 'The two-component signal transduction system RR06/HK06 regulates expression of cbpA in *Streptococcus pneumoniae*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 7701-6.
- Stegmann, T. 2000. 'Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion', *Traffic*, 1: 598-604.
- Stenz, L., P. Francois, K. Whiteson, C. Wolz, P. Linder, and J. Schrenzel. 2011. 'The CodY pleiotropic repressor controls virulence in gram-positive pathogens', *FEMS Immunol Med Microbiol*, 62: 123-39.
- Stevens, K. E., D. Chang, E. E. Zwack, and M. E. Sebert. 2011. 'Competence in *Streptococcus pneumoniae* is regulated by the rate of ribosomal decoding errors', *MBio*, 2.
- Stryker, L. M. 1916. 'Variations in the Pneumococcus Induced by Growth in Immune Serum', *J Exp Med*, 24: 49-68.
- Su, S., X. Fu, G. Li, F. Kerlin, and M. Veit. 2017. 'Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics', *Virulence*, 8: 1580-91.
- Subramanian, K., B. Henriques-Normark, and S. Normark. 2019. 'Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen', *Cell Microbiol*, 21: e13077.
- Sung, C. K., H. Li, J. P. Claverys, and D. A. Morrison. 2001. 'An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*', *Appl Environ Microbiol*, 67: 5190-6.
- Surve, M. V., S. Bhutda, A. Datey, A. Anil, S. Rawat, A. Pushpakaran, D. Singh, K. S. Kim, D. Chakravorty, and A. Banerjee. 2018. 'Heterogeneity in pneumolysin expression governs the fate of *Streptococcus pneumoniae* during blood-brain barrier trafficking', *PLoS Pathog*, 14: e1007168.
- Syk, A., M. Norman, J. Fernebro, M. Gallotta, S. Farmand, A. Sandgren, S. Normark, and B. Henriques-Normark. 2014. 'Emergence of hypervirulent mutants resistant to early clearance during systemic serotype 1 pneumococcal infection in mice and humans', *J Infect Dis*, 210: 4-13.
- Tanida, I., T. Ueno, and Y. Uchiyama. 2014. 'A super-ecliptic, pHluorin-mKate2, tandem fluorescent protein-tagged human LC3 for the monitoring of mammalian autophagy', *PLoS One*, 9: e110600.
- Tao, L., P. Chatteraj, and I. Biswas. 2012. 'CtsR regulation in mcsAB-deficient Gram-positive bacteria', *J Bacteriol*, 194: 1361-8.
- Throup, J. P., K. K. Koretke, A. P. Bryant, K. A. Ingraham, A. F. Chalker, Y. Ge, A. Marra, N. G. Wallis, J. R. Brown, D. J. Holmes, M. Rosenberg, and M. K. Burnham. 2000. 'A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Microbiol*, 35: 566-76.
- Tilley, S. J., E. V. Orlova, R. J. Gilbert, P. W. Andrew, and H. R. Saibil. 2005. 'Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin', *Cell*, 121: 247-56.
- Tiwari, S., S. B. Jamal, S. S. Hassan, Pvsd Carvalho, S. Almeida, D. Barh, P. Ghosh, A. Silva, T. L. P. Castro, and V. Azevedo. 2017. 'Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview', *Front Microbiol*, 8: 1878.
- Tranchemontagne, Z. R., R. B. Camire, V. J. O'Donnell, J. Baugh, and K. M. Burkholder. 2016. '*Staphylococcus aureus* Strain USA300 Perturbs Acquisition of Lysosomal Enzymes and Requires Phagosomal Acidification for Survival inside Macrophages', *Infect Immun*, 84: 241-53.
- Trihn, M., X. Ge, A. Dobson, T. Kitten, C. L. Munro, and P. Xu. 2013. 'Two-component system response regulators involved in virulence of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 in infective endocarditis', *PLoS One*, 8: e54320.
- Tseng, H. J., A. G. McEwan, J. C. Paton, and M. P. Jennings. 2002. 'Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress', *Infect Immun*, 70: 1635-9.
- Tu le, N., H. Y. Jeong, H. Y. Kwon, A. D. Ogunniyi, J. C. Paton, S. N. Pyo, and D. K. Rhee. 2007. 'Modulation of adherence, invasion, and tumor necrosis factor alpha secretion during the early stages of infection by *Streptococcus pneumoniae* ClpL', *Infect Immun*, 75: 2996-3005.

- Turner, A. G., C. Y. Ong, M. J. Walker, K. Y. Djoko, and A. G. McEwan. 2017. 'Transition Metal Homeostasis in *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*', *Adv Microb Physiol*, 70: 123-91.
- Uchiyama, S., A. F. Carlin, A. Khosravi, S. Weiman, A. Banerjee, D. Quach, G. Hightower, T. J. Mitchell, K. S. Doran, and V. Nizet. 2009. 'The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion', *J Exp Med*, 206: 1845-52.
- van Ginkel, F. W., J. R. McGhee, J. M. Watt, A. Campos-Torres, L. A. Parish, and D. E. Briles. 2003. 'Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 14363-7.
- Veiga, E., and P. Cossart. 2006. 'The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization', *Trends Cell Biol*, 16: 499-504.
- von Bargen, K., J. P. Gorvel, and S. P. Salcedo. 2012. 'Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle', *FEMS Microbiol Rev*, 36: 533-62.
- Wagner, C., Ad Saizieu Ad, H. J. Schonfeld, M. Kamber, R. Lange, C. J. Thompson, and M. G. Page. 2002. 'Genetic analysis and functional characterization of the *Streptococcus pneumoniae* vic operon', *Infect Immun*, 70: 6121-8.
- Watson, D. A., D. M. Musher, J. W. Jacobson, and J. Verhoef. 1993. 'A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery', *Clin Infect Dis*, 17: 913-24.
- Weeks-Gorospe, J. N., H. R. Hurtig, A. R. Iverson, M. J. Schuneman, R. J. Webby, J. A. McCullers, and V. C. Huber. 2012. 'Naturally occurring swine influenza A virus PB1-F2 phenotypes that contribute to superinfection with Gram-positive respiratory pathogens', *J Virol*, 86: 9035-43.
- Ween, O., P. Gaustad, and L. S. Havarstein. 1999. 'Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*', *Mol Microbiol*, 33: 817-27.
- Weiser, J. N., D. M. Ferreira, and J. C. Paton. 2018. '*Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion', *Nat Rev Microbiol*, 16: 355-67.
- Weiser, J. N., Z. Markiewicz, E. I. Tuomanen, and J. H. Wani. 1996. 'Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 64: 2240-5.
- Wu, Y., Y. Wu, B. Tefsen, Y. Shi, and G. F. Gao. 2014. 'Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11', *Trends Microbiol*, 22: 183-91.
- Wyllie, A. L., L. W. Rumke, K. Arp, Aatm Bosch, J. P. Bruin, N. Y. Rots, A. J. Wijmenga-Monsuur, E. A. M. Sanders, and K. Trzcinski. 2016. 'Molecular surveillance on *Streptococcus pneumoniae* carriage in non-elderly adults; little evidence for pneumococcal circulation independent from the reservoir in children', *Sci Rep*, 6: 34888.
- Yamamoto, A., Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, and Y. Tashiro. 1998. 'Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells', *Cell Struct Funct*, 23: 33-42.
- Yeganeh, B., S. Ghavami, M. N. Rahim, T. Klonisch, A. J. Halayko, and K. M. Coombs. 2018. 'Autophagy activation is required for influenza A virus-induced apoptosis and replication', *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1865: 364-78.
- Yesilkaya, H., A. Kadioglu, N. Gingles, J. E. Alexander, T. J. Mitchell, and P. W. Andrew. 2000. 'Role of manganese-containing superoxide dismutase in oxidative stress and virulence of *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 68: 2819-26.
- York, A., N. Hengrung, F. T. Vreede, J. T. Huiskonen, and E. Fodor. 2013. 'Isolation and characterization of the positive-sense replicative intermediate of a negative-strand RNA virus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E4238-45.
- Zakrzewicz, D., S. Bergmann, M. Didiasova, B. D. Giaimo, T. Borggreffe, M. Mieth, A. C. Hocke, G. Lochnit, L. Schaefer, S. Hammerschmidt, K. T. Preissner, and M. Wygrecka. 2016. 'Host-derived

- extracellular RNA promotes adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to endothelial and epithelial cells', *Sci Rep*, 6: 37758.
- Zhang, R., X. Chi, S. Wang, B. Qi, X. Yu, and J. L. Chen. 2014. 'The regulation of autophagy by influenza A virus', *Biomed Res Int*, 2014: 498083.
- Zhao, L., J. Zhu, H. Zhou, Z. Zhao, Z. Zou, X. Liu, X. Lin, X. Zhang, X. Deng, R. Wang, H. Chen, and M. Jin. 2015. 'Identification of cellular microRNA-136 as a dual regulator of RIG-I-mediated innate immunity that antagonizes H5N1 IAV replication in A549 cells', *Sci Rep*, 5: 14991.
- Zhirnov, O. P., and H. D. Klenk. 2013. 'Influenza A virus proteins NS1 and hemagglutinin along with M2 are involved in stimulation of autophagy in infected cells', *J Virol*, 87: 13107-14.
- Zhou, Z., X. Jiang, D. Liu, Z. Fan, X. Hu, J. Yan, M. Wang, and G. F. Gao. 2009. 'Autophagy is involved in influenza A virus replication', *Autophagy*, 5: 321-8.
- Zhu, L., and G. W. Lau. 2011. 'Inhibition of competence development, horizontal gene transfer and virulence in *Streptococcus pneumoniae* by a modified competence stimulating peptide', *PLoS Pathog*, 7: e1002241.
- Zhuge, X., Y. Sun, F. Xue, F. Tang, J. Ren, D. Li, J. Wang, M. Jiang, and J. Dai. 2018. 'A Novel PhoP/PhoQ Regulation Pathway Modulates the Survival of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Macrophages', *Front Immunol*, 9: 788.