

**“Estudio de los mecanismos moleculares
de interacción sinérgica entre
Streptococcus pneumoniae e influenza A”**

Por la Lic. Bioq. Clínica Melina Beatriz Cian

Director: Dr. José Ricardo Echenique

Facultad de Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



Córdoba, XX Julio de 2015.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	11
ABREVIATURAS.....	13
INTRODUCCIÓN.....	15
Capítulo 1. Biología de <i>Streptococcus pneumoniae</i>.	
- Fisiología, estructura y condiciones de crecimiento.....	15
- Epidemiología.....	15
- Factores de virulencia.....	16
- Cápsula de polisacáridos (CPS).....	17
- Fosforilcolina (PCho).....	17
- Proteínas de la superficie celular de neumococo.....	18
- Proteínas de unión a colina (Cbps).....	18
- Neumolisina.....	18
- Lipoproteínas.....	19
Capítulo 2. Sistemas de transducción de señales en bacterias.	
- Sistemas de dos componentes (TCS) en neumococo.....	21
- TCS12 – ComDE – 498.....	22
- Competencia.....	22
- Autólisis.....	23
- TCS05 – CiaRH – 494.....	24
- Otros sistemas de dos componentes.....	25
Capítulo 3. La transición de bacteria colonizante a invasiva.	
- Mecanismos de internalización: endocitosis y fagocitosis.....	26
- Endocitosis en la infección por <i>S. pneumoniae</i>	29
- Mecanismo de autofagia en las infecciones bacterianas.....	30
Capítulo 4. Virus influenza A humano.	
- Estructura del virión.....	33
- Clasificación, reservorio y huéspedes.....	34
- Genoma y mutaciones.....	35
- Evolución de IAV.....	37
- Mecanismo de infección de IAV.....	38
- Autofagia en la infección con IAV.....	40
Capítulo 5. Coinfección: <i>S. pneumoniae</i> e influenza A.	
- Patogénesis de la coinfección.....	42
- Efectos de la coinfección sobre el epitelio nasofaríngeo y pulmonar...	42

- <i>Afectación del sistema inmune</i>	43
- <i>Amplificación del ambiente inflamatorio</i>	44
- ¿Virus-Bacteria o Bacteria-Virus?.....	44
OBJETIVOS	46
RESULTADOS	47
Capítulo 1: Estudios de la sobrevivencia intracelular de neumococo.	
1.1 Detección y erradicación de <i>Mycoplasma</i> de las células de cultivo.....	47
1.2 Establecimiento de un modelo celular de trabajo.....	49
1.3 Optimización de la relación bacterias/células hospedadoras en el modelo de infección.....	50
1.4 Sobrevivencia intracelular de <i>S. pneumoniae</i>	52
1.5 Efecto de la inhibición lisosomal en la sobrevivencia de neumococo.....	53
1.6 Autofagia, ¿un mecanismo implicado en la infección por neumococo?.....	54
Capítulo 2: Sistemas de dos componentes.	
2.1 Implicancia de los sistemas de señalización en la invasión e internalización de neumococo.....	57
2.2 Profundización de los mecanismos que involucran a ComE y CiaRH en la sobrevivencia intracelular.....	60
Capítulo 3: Influenza A facilita la infección por neumococo.	
3.1 Internalización de <i>S. pneumoniae</i> posterior a una infección por IAV.....	62
3.2 Modelo celular de coinfección con IAV: selección de la MOI viral apropiada.....	63
3.3 Sobrevivencia intracelular de <i>S. pneumoniae</i> en presencia de IAV.....	65
3.4 Sistemas de transducción de señales de neumococo involucrados en la percepción de cambios causados por IAV en células A549.....	65
3.5 Determinación de la señal ambiental percibida por VisH.....	66
3.6 Rol de la autofagia en el mecanismo de coinfección.....	67
3.7 Rol de VisH en el mecanismo de autofagia durante la coinfección.....	68
DISCUSIÓN	70
MATERIALES Y MÉTODOS	81
ANEXOS	88
REFERENCIAS	90

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae (neumococo) es la principal causa de morbi-mortalidad en el mundo ya que ocasiona infecciones del tracto respiratorio medio, como otitis y sinusitis, y otras más severas como meningitis, neumonía y sepsis. Este patógeno Gram positivo coloniza la nasofaringe de forma asintomática y tiene la capacidad de diseminarse a los pulmones pudiendo acceder a la circulación sanguínea sistémica desde el espacio alveolar. En este proceso la bacteria interacciona con las células epiteliales pulmonares y el endotelio vascular de los capilares alveolares. Luego de la adhesión de neumococo a células epiteliales, se promueven los eventos de internalización e invasión. Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares que tienen lugar en dichos procesos. Por lo tanto, se llevaron a cabo estudios orientados a elucidar vías de señalización bacterianas y factores claves para los procesos de internalización y sobrevivencia de neumococo.

Los resultados obtenidos en la presente tesis aportan evidencias concretas de que neumococo pone en marcha una serie de procesos que le permiten mantenerse viable dentro de células A549 y RAW264.7 por varias horas, lo cual beneficia al proceso infeccioso. Durante la endocitosis, la maduración de aquellas vesículas que contienen bacterias se acompaña de un recambio de proteínas de tráfico celular y de una disminución gradual del pH (de 6,5 a 4,5). Estudios previos en nuestro laboratorio, han demostrado *in vitro* que en respuesta al pH ácido *S. pneumoniae* activa mecanismos que contribuyen a favorecer la liberación de compuestos de la pared celular, ADN y factores de virulencia. Sin embargo, se desconocen los efectos de la acidificación intracelular en el proceso de infección. En el presente trabajo se demostró, mediante el uso de inhibidores de la acidificación (bafilomicina A1 y cloroquina), que el pH ácido lisosomal es un factor necesario para la sobrevivencia intracelular de la bacteria. En estas condiciones, neumococo activa mecanismos de respuesta al estrés ácido que involucran a los sistemas de dos componentes (TCS): CiaRH y ComE. Estos TCS activan mecanismos opuestos en la bacteria: mientras que CiaRH es esencial para la respuesta de tolerancia al estrés ácido (ATR) promoviendo la sobrevivencia, ComE es fundamental en el desarrollo de lisis inducida por estrés ácido (ASIL). Sin embargo, el efecto de ATR predomina sobre el de ASIL y promueve la sobrevivencia de neumococo dentro de células A549. Estos hallazgos aportan conocimientos sobre la respuesta bacteriana bajo condiciones de estrés como las que deben enfrentar en los tejidos del hospedador, donde las bacterias necesitan sobrevivir a fin de establecer infecciones.

Para dilucidar el rol que cumplen los diferentes sistemas de señalización bacterianos en contexto de la relación huésped-patógeno, además de CiaRH y ComE, se estudiaron los demás TCS de neumococo y se identificaron a MicB, HK03, HK04, HK06, HK11, ComE y RitR como parte de la respuesta bacteriana al proceso de internalización, y a RitR y HK09 relacionados a la sobrevivencia intracelular en cultivos celulares.

Por otra parte, se conoce que *S. pneumoniae* y el virus influenza A (IAV) interactúan cooperativamente causando infecciones respiratorias más severas que pueden conducir a la muerte, aunque aún no se han descrito los mecanismos moleculares por los cuales ocurre este fenómeno. En este trabajo se demostró que neumococo percibe cambios intracelulares

ocasionados por una infección previa con IAV, que incrementan la internalización y sobrevivencia de la bacteria. Se identificó a la quinasa bacteriana VisH como proteína clave para el incremento de sobrevivencia de neumococo específicamente en células infectadas con IAV. Se ha visto que esta histidín quinasa detecta variaciones en la concentración de serina del medio de cultivo, pudiendo ser ese el cambio sentido dentro de las células infectadas por IAV. Por otra parte, si bien ambos patógenos por separado inducen acumulación de autofagosomas en células A549, se encontró que en la coinfección los niveles de LC3-II disminuyen después de 3 h de infección bacteriana. Este hallazgo indica que el mecanismo de autofagia está involucrado en la interacción sinérgica entre ambos patógenos. Además, la ausencia de VisH en la bacteria impide que los niveles de LC3-II disminuyan, sugiriendo que esta proteína está implicada en la disminución de los autofagosomas durante la coinfección con el virus. Estos hallazgos permiten explicar una parte de esta interacción biológica compleja entre ambos patógenos, y brinda caminos alternativos para futuras búsquedas de blancos terapéuticos.

SUMMARY

Streptococcus pneumoniae (the pneumococcus) is the leading cause of morbidity and mortality worldwide causing respiratory tract infections as otitis media, sinusitis, meningitis, pneumonia and sepsis. This Gram positive pathogen is an asymptomatic colonizer of nasopharynx and has the ability to spread to the lungs having access to the systemic circulation from the alveolar space. In this process the bacterium interacts with epithelial cells and pulmonary vascular endothelium of the alveolar capillaries. After adherence to epithelial cells pneumococcus promotes its internalization and invasion. However, the molecular mechanisms of these processes are not known. Therefore, studies to elucidate bacterial signaling pathways and key processes for pneumococcal internalization and survival factors were performed.

The results obtained in this thesis provide evidence that pneumococcus promotes mechanisms that allow for remaining viable in A549 and RAW264.7 cells for several hours, which is beneficial for the infective process. During endocytosis, maturation of vesicles containing bacteria is accompanied by a turnover of traffic proteins and a gradual decrease in pH (6.5 to 4.5). Previous *in vitro* studies in our laboratory demonstrated that under acid pH *S. pneumoniae* activates mechanisms contributing to promote the release of compounds of the cell Wall, DNA and virulence factors. However, during the infection process the intracellular effects of acidification are unknown. Using inhibitors acidification (bafilomycin A1 and chloroquine), it was shown that the lysosomal acid pH is necessary for intracellular survival of bacteria. Under these conditions, pneumococcus activates acid tolerance mechanisms (ATR) involving two-component systems (TCS): CiaRH and ComE. These TCS activates opposite bacterial mechanisms: while CiaRH is essential for ATR, promoting the bacterial survival, ComE is critical in the development of acid stress-induced lysis (ASIL). However, ATR effect predominates over ASIL supporting pneumococcal survival in A549 cells. These findings contributes to the knowledge about bacterial response under stress in host tissues where the bacteria need to survive in order to establish infections.

To elucidate the role of different bacterial signaling systems in context of host-pathogen relationship, in addition to CiaRH and ComE, other pneumococcal TCS were screened. We identified MicB, HK03, HK04, HK06, HK11, and ComE RitR as part of the response to bacterial internalization process and HK09 and RitR were related to intracellular survival in cell cultures.

Moreover, it is known that *S. pneumoniae* and influenza A Virus (IAV) cooperatively interact causing more severe respiratory infections that lead to death, although the molecular mechanisms by which this phenomenon occurs there have not been described. This work showed that pneumococcal perceived intracellular changes caused by previous infection with IAV, which correlates with increased bacterial internalization and survival. The bacterial kinase VisH was identified as a key protein for increasing of pneumococcal survival, specifically in cells infected with IAV.

It was found that this histidine kinase senses variations in serine concentration from the culture media, suggesting that this change could be detected within IAV infected cells. Furthermore, although both pathogens separately induced autophagosomal accumulation in A549 cells, it was found that during coinfection LC3-II levels decreased after 3 h of bacterial infection. This finding indicates that autophagy is involved in the synergistic interaction between the two pathogens. Furthermore, the bacterial mutant *visH* prevents LC3-II levels to decline, suggesting that this protein affect autophagosomal decrease during viral coinfection. These findings improve the comprehension of this complex biological interaction between pathogens and provide alternative paths for future therapeutic targets.

ABREVIATURAS

7-AAD:	7-amino-actinomicina D
ADN:	Ácido ribonucleico
ATPasa:	Adenosina trifosfatasa
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNc:	Ácido ribonucleico complementario
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosomal
ASIL:	Lisis inducida por estrés ácido (" Acid Stress Induced Lysis ")
ATR:	Respuesta de tolerancia al estrés ácido (" Acid Tolerance Response ")
BafA1:	Bafilomicina A1
BHI:	Infusión cerebro-corazón (" Brain-Heart Infusion ")
BLP:	Péptido tipo bacteriocina (" Bacteriocin-Like Peptide ")
Bp:	Pares de bases (" Base Pairs ")
Cbp:	Proteína unidora de Colina (" Choline Binding Protein ")
Chq:	Cloroquina (" Chloroquine ")
Cia:	Inducción de competencia y alteración en la susceptibilidad a la cefotaxima (" Competence-Induction and Altered cefotaxime susceptibility ")
CPS:	Polisacárido capsular (" Capsular Polysaccharides ")
CSP:	Péptido estimulador de la competencia (" Competence Stimulating-Peptide ")
CTAB:	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
DAPI:	4,6-diamino-2-fenilindol (" 4,6-Di Amino-2-PhenylIndol ")
DMEM:	" Dulbecco's Modified Eagle Medium "
DO:	Densidad óptica
EDTA:	Ácido etilendiamino tetra-acético
EEA-1:	Antígeno de endosoma temprano 1 (" Early-Endosomal Antigen-1 ")
EPEC:	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
Er:	Eritromicina
GalNac:	N-acetil-D-galactosamina
GTPasas:	Guanosina trifosfatasas (" Guanosine Tri Phosphatases ")
HA:	Hemaglutinina
HK:	Histidin quinasa
H+-ATPasa:	Protón ATPasa
IAV:	Virus influenza A (" Influenza A Virus ")
IBV:	Virus influenza B (" Influenza B Virus ")
ICV:	Virus influenza C (" Influenza C Virus ")
IFN-1:	Interferon tipo I
Ig:	Inmunoglobulina
Kan:	Kanamicina
LAMP-1:	" Lysosomal-Associated Membrane Protein 1 "
LB:	Luria-Bertani
LC3:	Cadena liviana 3 (" Light-Chain 3 ")
LIR:	Región de interacción con LC3 (" LC3-Interacting Region ")
LytA:	N-acetilmuramoyl-L alanina amidasa

MAP1:	Proteína asociada a microtúbulos 1 (<i>"Microtubule-Associated Protein 1"</i>)
MDF:	Medio químicamente Definido
MOI:	<i>"Multiplicity of Infection"</i>
NA:	Neuraminidasa
NanA:	Neuraminidasa A
NEP:	Proteína de exportación nuclear (<i>"Nuclear Exportation Protein"</i>)
NK:	Células <i>"Natural Killers"</i>
NS:	Proteína No-Estructural (<i>"Non-Structural"</i>)
OMS:	Organización Mundial de la Salud
ORFs:	Marcos de lectura abiertos (<i>"Open Reading Frames"</i>)
PAF-R:	Receptor del factor activador plaquetario
PAGE:	Electroforesis en gelde poliacrilamida (<i>"Polyacrylamide gel electrophoresis"</i>)
PCho:	Fosforilcolina (<i>"Phosphorylcholine"</i>)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>"Polimerase Chain Reaction"</i>)
PE:	Fosfatidiletanolamina (<i>"Phosphatidylethanolamine"</i>)
PS:	Fosfatidilserina (<i>"Phosphatidylserine"</i>)
Ply:	Neumolisina
PR8:	Cepa influenza A/PuertoRico/8/34 (H ₁ N ₁)
PsaA:	Antígeno de superficie A
PspA:	Proteína de superficie A
PspC:	Proteína de superficie C
plgR:	Receptor de la Inmunoglobulina polimérica (<i>"Polymeric Immunoglobulin Receptor"</i>)
Rapa:	Rapamicina
Rit:	Regulador del transporte de Hierro (<i>"Regulator of Iron Transport"</i>)
RNP:	Ribonucleoproteínas
RR:	Regulador de respuesta
SDS:	Dodecil sulfato de sodio (<i>"Sodium Dodecyl-Sulfate"</i>)
SLiMs:	Motivos Lineales Cortos (<i>"Short Linear Motifs"</i>)
Spc:	Espectinomicina
Spx:	Sparfloxacina
STS:	Sistema de transducción de señales
TCS:	Sistema de dos componentes (<i>"Two-Component System"</i>)
TLRs:	Receptores Tipo Toll (<i>"Toll-Like Receptors"</i>)
TNF-1:	Factor de necrosis tumoral (<i>"Tumor-Necrosis Factor 1"</i>)
Tx:	Tratamiento
UFC:	Unidades Formadoras de Colonias
Vis:	<i>"Viral Infection Sensing"</i>

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. Biología de *Streptococcus pneumoniae*.

Streptococcus pneumoniae (neumococo) es un microorganismo que habita en el tracto respiratorio superior como parte de la microbiota residente de la nasofaringe humana. Es el agente causal de infecciones locales tales como otitis media y sinusitis, y de enfermedades invasivas como neumonía lobar, sepsis y meningitis (Cartwright, 2002).

En 1881, Louis Pasteur aisló por primera vez esta bacteria de la saliva de un paciente con rabia. 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 (Mandell, 2011).

Fisiología, estructura y condiciones de crecimiento.

S. pneumoniae es un coco Gram positivo que típicamente se presenta de a pares (diplococos), pero puede también verse de forma única, lanceolada, o formando cadenas cortas. Su tamaño varía de 0,5 a 1,2 μm de diámetro y posee un metabolismo respiratorio anaerobio facultativo. Para su crecimiento y multiplicación requiere 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 cordero. Esta bacteria carece de la enzima catalasa, la cual debe ser aportada en forma exógena; en la práctica es proporcionada por la catalasa de los eritrocitos. El crecimiento bacteriano se ve facilitado en un ambiente con 8 a 10% de CO_2 . 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), rodeándose de un halo verdoso. *S. pneumoniae* es sensible a la optoquina y en presencia de bilis o sales biliares se produce una destrucción o lisis bacteriana. Estas características fenotípicas son la base para la identificación de especie.

Epidemiología

S. pneumoniae es la mayor causa infecciosa de morbi-mortalidad en el mundo, provocando más muertes que cualquier otro patógeno humano. Las poblaciones de mayor riesgo son los niños menores a 5 años y los adultos mayores a 65. En países en desarrollo, se estima que más de 1 millón de niños menores de 5 años muere anualmente por neumonía neumocócica (Nuorti *et al.*, 2010; Levine *et al.*, 2006). Neumococo causa infecciones del tracto respiratorio medio, y otras más severas como neumonía, septicemia y meningitis. En Estados Unidos, la letalidad de la meningitis neumocócica es cercana al 30%, mientras que en la septicemia y neumonía es del 20% y el 5% respectivamente (Tomasz, 1997; Varon, 2012).

Aunque neumococo puede causar enfermedades letales, comunmente se encuentra como un colonizante natural del tracto respiratorio superior, siendo el 60% de los niños portadores

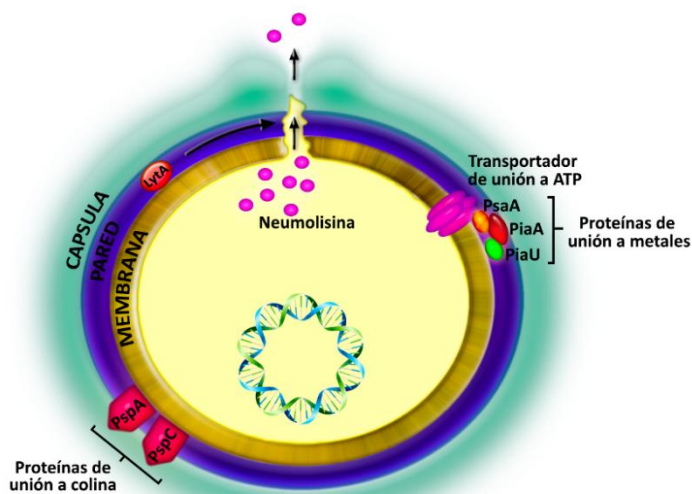
asintomáticos (Henriques-Normark *et al.*, 2013; Nunes *et al.*). Existen 91 serotipos capsulares, con diferencias estructurales y antigénicas en los polisacáridos de la cápsula. La frecuencia de portación alrededor de los 2-3 años de edad es elevada, y disminuye a partir de entonces hasta llegar a un 10% en la vida adulta.

La infección por *S. pneumoniae* se transmite via persona a persona a través de gotas o aerosoles de personas infectadas. Las bacterias ingresan a la cavidad nasal y se adhieren a células epiteliales nasofaríngeas (Austrian, 1986). Esta adherencia ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro* y es considerada el primer paso antes de la colonización y/o invasión eficiente (Cundell *et al.*, 1995; Weiser *et al.*, 1996; Bogaert *et al.*, 2004). Una vez en nasofarínge, este patógeno puede entonces permanecer como un colonizador o propagarse a otros órganos como oídos, senos paranasales y pulmones, pudiendo potencialmente entrar al torrente sanguíneo y cruzar la barrera hematoencefálica para causar meningitis.

Habitualmente, los serotipos de neumococo responsables de causar infecciones son los que se encuentran con mayor frecuencia en los portadores. La propagación del organismo de persona a persona, dentro de una familia o de la casa se ve influenciada por factores tales como el hacinamiento, la estación del año y la presencia de infecciones respiratorias superiores o enfermedades neumocócicas como neumonía u otitis media. Las infecciones son más prevalente durante el invierno y en primavera, cuando las enfermedades respiratorias son más frecuentes.

Factores de virulencia

Un prerequisite para la invasividad de neumococo son las habilidades de penetrar células epiteliales y de atravesar los tejidos barrera para ganar acceso a la submucosa y la sangre. Los mecanismos que promueven la invasividad están asociados con la expresión de factores de virulencia (Esquema 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. Estos componentes bacterianos no afectan la vitalidad del microorganismo, sin embargo facilitan la evasión inmune, la adherencia y la invasión en la célula huésped.



Esquema 1. Factores de virulencia de neumococo.

Los determinantes de virulencia en *S. pneumoniae* contribuyen en la patogenicidad de la bacteria, entre los que 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 en neumococo, como los sistemas de dos componentes (adaptado de Kadioglu, 2008.)

Cápsula de polisacáridos (CPS)

La cápsula de polisacáridos es uno de los factores de virulencia más importantes de neumococo. Su rol en la virulencia deriva de su actividad antifagocítica, conferida en gran medida por la carga negativa del polisacárido (Gupta *et al.*, 2013; Sanders *et al.*, 2011; Jonsson *et al.*, 1985). Como parte de la respuesta inmune, la bacteria es recubierta por anticuerpos y complemento, para permitir la fagocitosis del microorganismo. En neumococo, la presencia de cápsula evita la interacción de la porción Fc de las inmunoglobulinas y de la fracción C3bi de complemento, con sus respectivos receptores en la superficie de las células fagocíticas, resultando en la evasión de la fagocitosis (Musher, 1992; Kjos *et al.*, 2015). La cápsula también es crucial para la colonización, dado que facilita el acceso a la superficie epitelial a través de las secreciones mucosas del huésped (Nelson *et al.*, 2007), y reduce la exposición a los antibióticos (van der Poll *et al.*, 2009).

La transición de microorganismo comensal a patógeno es clave en la relación entre *S. pneumoniae* y su hospedador. Debido a su efecto inhibitorio de la adherencia a células epiteliales, la expresión de una cápsula gruesa se torna una desventaja para neumococo. El progreso en la interacción con las células huésped consiste en un cambio en la expresión de importantes determinantes de virulencia para adaptarse a un microambiente alterado. La expresión máxima de la cápsula es esencial para la virulencia sistémica, pero el grado de exposición de otras estructuras de superficie, como adhesinas, también se ve desfavorecida por el espesor capsular (Talbot *et al.*, 1996; Hammerschmidt *et al.*, 2005). Por lo tanto, la regulación de los genes que codifican para enzimas productoras de cápsula a nivel de transcripción, traducción y modificaciones postraduccionales son importantes para la supervivencia de *S. pneumoniae* en los diferentes ambientes del huésped.

Fosforilcolina (PCho)

La estructura de peptidoglicano es clásica de bacterias Gram positivas, sin embargo, la pared celular de neumococo es inusual, ya que contiene ácido teicoico con una estructura esqueleto conformada por ribitol y fosforilcolina (PCho) unida covalentemente, convirtiéndola en otro factor de virulencia (Bean *et al.*, 1977; Mahdi *et al.*, 2013). 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).

Se ha propuesto a PCho como adhesina bacteriana al ser un componente estructural inusual en la pared de neumococo, aunque no específico de esta bacteria. Es característico de la superficie celular de otros microorganismos que residen en el tracto respiratorio superior, tales como *Haemophilus influenzae* y especies patógenas del género *Neisseria spp.*

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 importante para la colonización (Kadioglu *et al.*, 2008). En neumococo, PCho media la adherencia bacteriana al receptor del Factor Activador de Plaquetas (PAF-R), el cual se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos del huésped, como así también en la superficie epitelial de la nasofaringe humana (Cundell *et al.*, 1995). El ligando fisiológico de este receptor es el Factor Activador de Plaquetas (PAF), cuya estructura y composición también contiene PCho. De esta manera, 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

Se han identificado tres grupos de proteínas de la superficie celular que intervienen como factores de virulencia: 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 sortasa (LPXTG; donde X denota cualquier aminoácido) (Kadioglu *et al.*, 2008).

Proteínas de unión a colina (Cbps).

Como se mencionó anteriormente, neumococo expresa PCho como un componente del ácido teicoico y lipoteicoico. Las Cbps están ancladas a la superficie celular a través de la interacción de secuencias repetidas de 20 aminoácidos y **PCho** presente en la pared celular neumocócica. El genoma de *S. pneumoniae* codifica aproximadamente 15 Cbps (Bergmann *et al.*, 2006), aunque su número varía dependiendo de la cepa de neumococo. Cuatro enzimas hidrolíticas de la pared celular (LytA, LytB, LytC y CbpE) han sido implicadas en virulencia.

LytA (N-acetilmuramoil-L alanina amidasa) es la principal autolisina de neumococo. Su activación desencadena la lisis de la pared celular, liberando productos altamente inflamatorios, como por ejemplo neumolisina (Ply), otro factor de virulencia implicado en la formación de poros en membranas celulares que poseen colesterol (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015; Martner *et al.*, 2008; Hirst *et al.*, 2008). Sin embargo, **LytB**, **LytC** y **CbpE** están involucrados en la colonización nasofaríngea, así como también en la migración a través de la matriz extracelular (Bai *et al.*, 2014); (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011; Perez-Dorado *et al.*, 2010; Gosink *et al.*, 2000; Attali *et al.*, 2008). Otra importante Cbp es la proteína neumocócica de superficie A (**PspA**), ya que mutantes que carecen de esta proteína han reducido su virulencia en un modelo de sepsis (Berry *et al.*, 2000). **PspA** interfiere con el sistema complemento (Ochs *et al.*, 2008) y también se une a lactoferrina (Bitsaktsis *et al.*, 2012). 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 (Yuste *et al.*, 2010). **PspC** actúa como una adhesina anclada a PCho, se une al componente secretor humano presente en el receptor de inmunoglobulina polimérica (Rosenow *et al.*, 1997; Graham *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2010; Hammerschmidt *et al.*, 1997) y proporciona resistencia al complemento mediante la unión al Factor H (Dave *et al.*, 2001).

Neumolisina

Descrita originalmente como hemolisina, la neumolisina (o **Ply**) pertenece a la familia de toxinas formadoras de poros y es producida por más de 20 especies de bacterias Gram positivas. Es una proteína de 53 kDa, presente en la mayoría de los aislamientos clínicos de neumococo, y se expresa durante la fase logarítmica tardía de crecimiento, aunque carece de una secuencia señal de secreción característica en el extremo N-terminal (Benton *et al.*, 1997). Como consecuencia, durante años se pensó que la misma es liberada bajo el mecanismo de autólisis inducida por la autolisina **LytA** en la fase logarítmica de crecimiento. Sin embargo, Balachandran *et al.* (Balachandran *et al.*, 2001) reportaron que la liberación de Ply en diferentes cepas de neumococo, incluyendo una cepa clínica virulenta, ocurre al final de la fase de latencia y en ausencia de la mayor autolisina LytA, indicando que existe una liberación de Ply independiente de autólisis. Posteriormente, se demostró su localización en la pared bacteriana (Price *et al.*, 2009), y se identificó el dominio necesario para su exportación. Estos hallazgos también han demostrado que

en *S. pneumoniae*, una secuencia señal no es suficiente para una liberación dependiente del sistema de secreción bacteriana *Sec*, pero sí resulta adecuada para *Bacillus subtilis* (Price *et al.*, 2012).

El mecanismo de acción de Ply consta inicialmente de la unión al colesterol de la membrana y la formación de poros (30 nm de diámetro) por la oligomerización de hasta 50 monómeros de toxina (Morgan *et al.*, 1995). De la misma manera, media otros efectos en concentraciones sublíticas, incluyendo la activación de la vía clásica del complemento, aún en ausencia de anticuerpos específicos (Mitchell *et al.*, 1991; Ali *et al.*, 2013; Marriott *et al.*, 2008).

Lipoproteínas

Se ha demostrado que la **PsaA** cumple un rol en la adherencia de neumococo a células epiteliales, siendo E-cadherina el receptor de la célula hospedadora (Anderton *et al.*, 2007). Diferentes mutaciones en PsaA causaron efectos pleiotrópicos incluyendo una menor adherencia de neumococos a las células huésped, la atenuación en un modelo murino de infección intranasal e intraperitoneal y el aumento al estrés oxidativo (Marra *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2013). PsaA forma parte de un transportador ABC que transporta manganeso. En este complejo, PsaA es la lipoproteína de unión al sustrato, PsaB es la proteína de unión al ATP y PsaC es la permeasa.

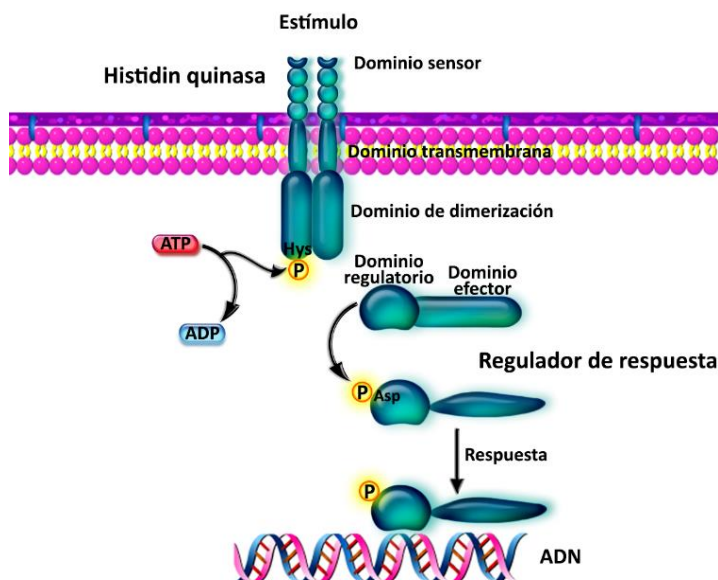
Otras lipoproteínas involucradas en la virulencia son **PiaA** y **PiuA**, las cuales están involucradas en la captación de hierro (Brown *et al.*, 2001; Jomaa *et al.*, 2005; Trappetti *et al.*, 2011).

De esta manera, con este arsenal de factores de virulencia, la bacteria lucha por la supervivencia contra otras bacterias y contra el propio huésped. Conocer del funcionamiento de cada uno de estos factores, permite entender las estrategias y mecanismos que utiliza el microorganismo en el desarrollo de una enfermedad.

Capítulo 2. Sistemas de transducción de señales en bacterias.

Las bacterias continuamente están en contacto con condiciones ambientales fluctuantes, ya sean cambios en el pH, condiciones redox, concentración de diferentes iones, etc. Es así que frente a situaciones diversas, los sistemas de transducción de señales desempeñan un rol importante en la regulación de la homeostasis bacteriana, poniendo en marcha una respuesta adecuada para poder sobrevivir y habitar. La esencia de la transducción de señales es la conversión de una señal/estímulo en una activación o represión de genes cuyos productos responden específicamente a la señal que desencadenó el evento. A pesar de existir una gran diversidad de estímulos y respuestas, las bacterias utilizan un número relativamente pequeño de estrategias moleculares para la señalización, siendo la fosforilación de proteínas un evento fundamental. En eucariotas, la mayoría de las cascadas de señalización implican proteínas quinasas que fosforilan específicamente residuos Ser, Thr o Tyr, y regulan la función de proteínas blanco. Sin embargo, en los sistemas de señalización procariotas predomina un esquema de fosforilación diferente. Estas vías de señalización, denominados sistemas de dos componentes (**TCS: two-component systems**), están constituidas por dos proteínas conservadas: una histidin-quinasa (HK) asociada a membrana, que actúa como sensor autofosforilable en residuos histidina, y un regulador de respuesta (RR) fosforilable en residuos Asp (Jung *et al.*, 2012). De este modo, cuando el RR es fosforilado por una HK en un dominio denominado receptor, adquiere cambios conformacionales que le permiten la regulación de la expresión génica o la función proteica. En muchos casos, los RR actúan como reguladores transcripcionales a través de su unión al ADN (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000) (**Esquema 2**).

Los sistemas de fosfotransferencia están ampliamente distribuidos en las bacterias y se ha demostrado que modulan una gran variedad de respuestas celulares, tales como osmoregulación, quimiotaxis, esporulación, competencia, fotosíntesis y patogenicidad (Garvis *et al.*, 2001; Rosch *et al.*, 2008; Paterson *et al.*, 2006; Pinas *et al.*, 2008). Algunos de estos TCS son esenciales para la viabilidad de la bacteria (Fabret *et al.*, 1998; Lange *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000), y como se encuentran ausentes en los vertebrados, reciben especial atención como posibles blancos en terapias antimicrobianas (Li *et al.*, 2009).



Esquema 2. Estructura de los TCS bacterianos.

La detección de un estímulo externo se realiza a través de la HK. Esta proteína transmembrana utiliza ATP celular para autofosforilarse en un residuo histidina conservado. El grupo fosfato es posteriormente transferido a un residuo Aspartato, en el RR citoplasmático. La proteína RR fosforilada puede controlar la regulación génica por unión a regiones promotoras de los genes blanco (adaptado de Stock, 2000).

Sistemas de dos componentes en neumococo

El análisis del genoma de neumococo permitió identificar 14 sistemas de traducción de señales, de los cuales existen 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 las HK y los 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. Cuando se agrupan los RRs en base a la homología dentro del dominio efector, es posible agruparlos dentro de cuatro familias de proteínas que se unen al ADN: OmpR/PhoB, LuxR/Nar, AraC/Lyt y AgrA/Agr.

La función y contribución a la virulencia de cada uno de los TCS de neumococo se encuentran resumidos en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Sistemas de dos componentes en *S. pneumoniae*.

TCS	Alternative name	Rol demostrado en virulencia/Implicancia en mecanismos*	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.	Throup, 2000; Hava & Camilli, 2002.
02	<i>vicRK, micAB, yycFG</i> , 492	- <i>rr02</i> es el único regulador de respuesta esencial para la supervivencia de neumococo. - Regulación de pared celular y biosíntesis de ácidos grasos. Regulador de la expresión de <i>pspA</i> . Regulación de competencia.	Wagner, 2002; Echenique, 2001; Kadioglu, 2003; Mohedano, 2005; Ng, 2003, 2005.
03	474	- Respuesta al estrés por vancomicina. - No se evidenció rol en virulencia.	Haas, 2005.
04	<i>pnpRS</i> , 481	- En ciertas cepas controla la expresión de <i>psaA</i> , regula virulencia y resistencia al estrés oxidativo.	McCluskey, 2004.
05	<i>ciaRH</i> , 494	- Estrés ácido, competencia, virulencia, resistencia a cefotaxima.	Throup, 2000; Echenique, 2000. Marra, 2002.
06	478	- Regulación de factores de virulencia CbpA y PspA.	Throup, 2000; Standish, 2005.
07	539	- Involucrado en virulencia en un modelo murino.	Throup, 2000; Hava & Camilli, 2002.
08	484	- Metabolismo de celobiosas. - Regulación del pilus (cepa TIGR4).	Throup, 2000; Song, 2008; McKessar, 2007.
09	<i>zmpSR</i> , 488	- Rol importante en virulencia en modelos de neumonía y bacteriemia.	Throup, 2000; Hava & Camilli, 2002; Lau, 2001; Blue & Mitchell 2001.
10	<i>vncRS</i> , 491	- Tolerancia a vancomicina. - No se evidenció rol en virulencia.	Robertson, 2002; Haas, 2004.
11	479	- Respuesta al estrés por vancomicina. - Producción biofilm.	Haas, 2005; Cockeran, 2014.

12	<i>comDE</i> , 498	- Competencia y autólisis.	Lau, 2001; Bartilson, 2001; Kowalko, 2008; Hava & Camilli, 2002; Piñas, 2008. Cian, 2015.
13	<i>blpRH</i> , 486	- Control del regulón de quorum-sensing que involucrado en la síntesis y exportación de péptidos del tipo bacteriocinas.	Throup, 2000; de Saizieu, 2000; Dawid, 2007.
14	<i>ritR</i> , 489	- 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.	Throup, 2000; Ulijasz, 2004; Ong, 2013.

* En algunos casos, los resultados varían según las cepas y modelos experimentales de infección utilizados.

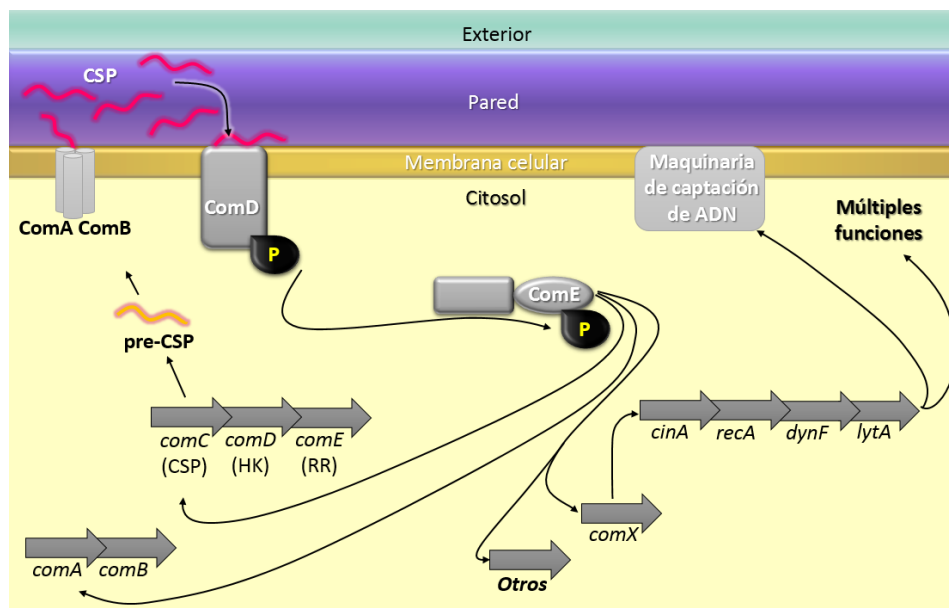
Características relevantes de los TCS más estudiados hasta el momento.

TCS12 /ComDE / 498

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 *et al.*, 2002). La inducción de competencia para la transformación genética natural depende de una vía de señalización que involucra al péptido estimulante de la competencia (**CSP: Competence-Stimulating Peptide**) (Havarstein *et al.*, 1995) y al sistema regulatorio de dos componentes TCS12, mayormente conocido por ComDE (Pestova *et al.*, 1996). CSP es producido a partir de un pre-péptido codificado por el gen *comC*, exportado por el transportador ComAB y escindido para generar el péptido maduro (Havarstein *et al.*, 1995; Hui *et al.*, 1995). 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 un cambio conformacional en el dominio transmembrana de ComD que provoca su autofosforilación. Posteriormente, ComD fosforila a su regulador de respuesta, ComE, el cual activa la transcripción de genes tempranos de competencia (Claverys *et al.*, 2002; Claverys *et al.*, 2006), 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 (Lee *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2003) (**Esquema 3**).

La mutante carente de ComD en modelos de neumonía y bacteriemia demostró el vínculo entre competencia y virulencia (Bartilson *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Hava *et al.*, 2002). 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.



Esquema 3. Regulación de la competencia en *S. pneumoniae*.

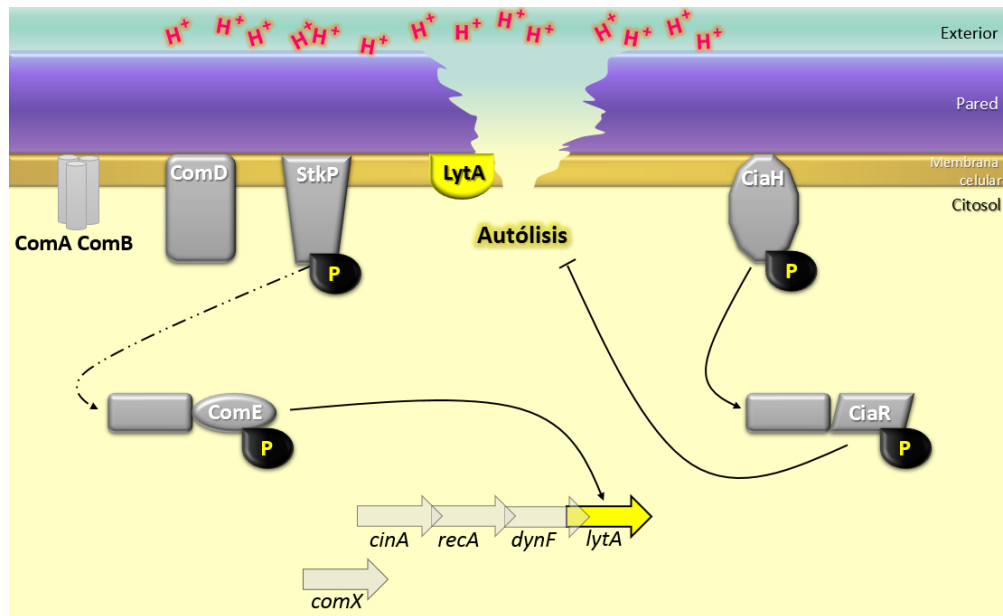
La activación del estado de competencia involucra una serie de eventos requeridos para la captación de ADN desde el exterior. La transformación bacteriana es mediada por un péptido estimulante de la competencia (CSP), que es codificado por *comC*. El pre-péptido es escindido durante su exportación a través de ComAB. El péptido maduro se acumula en el medio externo y luego de alcanzar una concentración crítica, activa ComD (HK). La transferencia del grupo fosfato ocurre desde HK hacia ComE, su RR correspondiente. La activación de ComE es capaz de regular la expresión del operón *comCDE* y *comAB*, que activan la transcripción de *comX*, que codifica para un factor sigma alternativo. ComX activa genes involucrados en la competencia, incluyendo el aparato de captación de ADN como también otros que no están vinculados con competencia (Adaptado de (Paterson et al., 2006).

Autólisis

En bacterias, la autólisis es uno de los mecanismos más evidentes de muerte celular programada, formando parte de procesos del desarrollo bacteriano, tales como la transformación, esporulación y la formación de cuerpos de fructificación mixobacteriana. Este mecanismo se desencadena por una autodigestión de la pared celular llevada a cabo por hidrolasas de peptidoglicano. En diferentes especies bacterianas, también se asocia la autólisis con la regulación de la transformación natural (Lewis, 2000). 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).

Además de la activación de LytA mediada por ComE durante el desarrollo de competencia en medios ligeramente alcalinos, la inducción de autólisis por antibióticos es la más difundida por su importancia clínica (Mascher et al., 2006). En nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que el estrés ácido también es un inductor de lisis en neumococo (Pinas et al., 2008). 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, de la quinasa ComD y del factor ComX (Pinas et al., 2008) (Esquema 4). Por otra parte, se ha descrito que StkP, la única serin/treonin quinasa en neumococo (Echenique et al., 2004), es requerida para el desarrollo de ASIL y participa en la vía regulada por ComE (Pinas et al., 2008).

Otro punto de control del operón *comCDE* a pH 7.8 es el TCS05 (*ciaRH*) ((Guenzi *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2000; Echenique *et al.*, 2000), que también está involucrado en mecanismos de resistencia a distintos tipos de estrés. Se ha visto que este sistema de señalización ejercería un rol protector de la bacteria, frente a la autólisis, independiente de la activación mediada por ComE (Pinas *et al.*, 2008).



Esquema 4. Modelo de respuesta al estrés ácido mediado por ComE.

Como respuesta al estrés ácido ComE es fosforilado por un mecanismo aún no conocido, lo que resulta en la inducción de autólisis. En esta vía también participa la serin/treonin quinasa StkP, la cual es requerida en etapas previas y también posteriores a la fosforilación de ComE. Por una vía independiente el sistema de dos componentes CíaRH ejerce un rol protector frente a la autólisis inducida por estrés ácido (Pinas *et al.*, 2008).

TCS05 / CíaRH / 494

El sistema de dos componentes CíaRH (*Competence-Induction and Altered cefotaxime susceptibility*) de neumococo se identificó en una búsqueda de mutantes espontáneas resistentes al antibiótico cefotaxima (Guenzi *et al.*, 1994). Este sistema de señalización afecta una diversidad de procesos como el desarrollo de competencia, autólisis, producción de bacteriocinas, respuesta a microaerobiosis, colonización en el huésped, resistencia a antibióticos y virulencia (Guenzi *et al.*, 1995; Throup *et al.*, 2000; Echenique *et al.*, 2000; Zahner *et al.*, 2002; Halfmann *et al.*, 2011; Marx *et al.*, 2014). El desarrollo de competencia produce un estrés transitorio en las bacterias, siendo CíaRH el sistema requerido para afrontar el estado de transformabilidad (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Por otro lado, en ausencia de CíaR, la autólisis incrementa en respuesta a la inducción de competencia. Este hallazgo demostró que CíaRH es importante para mantener la integridad de la célula, haciendo frente a condiciones inductoras de lisis (Zahner *et al.*, 2002; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Mascher *et al.*, 2006; Pinas *et al.*, 2008).

Una conexión clave entre CíaRH y competencia es el control que ejerce en la expresión de HtrA, una proteasa relacionada a estrés. En mutantes *ciaRH* se ha observado que la transcripción de *htrA* disminuye (Ibrahim *et al.*, 2004; Paterson *et al.*, 2006), mientras que su restauración reestablece el estado de competencia natural (Sebert *et al.*, 2005). Asimismo, cepas carentes de HtrA mostraron una fuerte reducción de la carga bacteriana, reducida diseminación e inflamación

en pulmones de ratones infectados, confirmando la implicancia de este factor en la virulencia de neumococo. Por otro lado, existen estudios que sugieren que CiaRH esta involucrado en la respuesta de neumococo al oxígeno y a iones calcio (Echenique *et al.*, 2000; Echenique *et al.*, 2001; Giammarinaro *et al.*, 1999).

Algunos patógenos bacterianos son capaces de sobrevivir en condiciones ácidas por un mecanismo denominado “respuesta de tolerancia al ácido” (ATR, por sus siglas en inglés Acid Tolerance Response), un fenómeno por el cual un organismo aumenta su capacidad de resistir un pH letal como consecuencia de una exposición previa a un pH subletal (Cotter *et al.*, 2003). Con el fin de sobrevivir dentro de la célula hospedadora, diferentes bacterias resisten los ambientes ácidos encontrados durante los procesos de endocitosis o fagocitosis, donde el pH fagosomal varía de 4.5 a 5.5 debido a la actividad de la ATPasa vacuolar. Se ha demostrado que CiaR participa en el mecanismo de ATR ya que en mutantes que carecen de este TCS la sensibilidad al pH se encuentra incrementada. Por lo tanto este sistema de señalización favorece el desarrollo de tolerancia al estrés ácido (Pinas *et al.*, 2008; Cian *et al.*, 2015).

Otros sistemas de dos componentes

Diferentes TCS han sido parcialmente caracterizados; entre ellos, TCS13 (BlpHR), que es inducido por el péptido BlpC que controla la producción de bacteriocina (de Saizieu *et al.*, 2000); TCS04, que está involucrado en la regulación de PsaA (McCluskey *et al.*, 2004) y TCS06, un sistema regulador de la expresión de CbpA (Agarwal *et al.*, 2012). El único RR esencial es MicA (RR02) (Echenique *et al.*, 2001; Kadioglu *et al.*, 2003), que regula la expresión de PspA. RitR (RR14) está involucrado en el transporte de hierro (Ulijasz *et al.*, 2004; Ulijasz *et al.*, 2009). Se ha demostrado que 8 de los 14 TCS, son críticos para el crecimiento en modelos murinos de infección del tracto respiratorio, asignándole una gran importancia en la patogénesis de *S. pneumoniae* (Hava *et al.*, 2002).

Capítulo 3. La transición de bacteria colonizante a invasiva.

La conversión de un microorganismo comensal en uno invasivo es acompañada por el traspaso de barreras tisulares, una subsecuente adaptación del patógeno a diferentes nichos y una alteración de la acción regulatoria por parte del sistema inmune (Ghaffar *et al.*, 1999). La invasión a células hospedadoras es un proceso con múltiples etapas, y se inicia con la adhesión de la bacteria a la superficie celular. *S. pneumoniae* se une con avidéz a las células epiteliales de la nasofaringe y pulmón, así como a células endoteliales periféricas y de la microvasculatura cerebral (Grigg *et al.*, 2012; Yokota *et al.*, 2010; Iovino *et al.*, 2014).

La cápsula de neumococo resulta ventajosa para evadir las barreras del hospedador y alcanzar la mucosa respiratoria (Ring *et al.*, 1998; Kjos *et al.*, 2015). Sin embargo, la capsula representa una desventaja para la invasión a la célula huésped, ya que la cobertura de polisacáridos presentes en la pared celular oculta los sitios de unión al epitelio (Hammerschmidt *et al.*, 2005; Wartha *et al.*, 2007). Para lograr una infección exitosa, la bacteria modula sus propiedades de unión al entorno a través de un proceso llamado variación de fase. En este mecanismo, la cantidad de polisacárido capsular varía entre un fenotipo opaco (cápsula gruesa) y uno transparente (cápsula delgada), cubriendo o exponiendo diferentes moléculas de adhesión respectivamente. Durante la colonización, la cápsula gruesa evita el atrapamiento bacteriano dentro de la mucosidad, así como también la unión a inmunoglobulinas y complemento, evitando de esta manera la opsonofagocitosis. Una vez que el neumococo ha alcanzado el epitelio nasofaríngeo, regula su expresión génica, manifestando un fenotipo transparente y se une a glicoconjugados que se expresan en la mucosa respiratoria, como por ejemplo N-acetil-D-galactosamina (GalNac). La unión a esta molécula es promovida por Neuraminidasa A (NanA), una glicosidasa neumocócica que escinde el ácido siálico presente en mucinas, glicolípidos, glicoproteínas, y oligosacáridos, mejorando de este modo la adhesión bacteriana al epitelio (Brittan *et al.*, 2012; Parker *et al.*, 2009; King *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha descrito que los residuos de ácido siálico escindidos sirven como una fuente de hidratos de carbono para el metabolismo bacteriano (Severi *et al.*, 2007; King *et al.*, 2006; Yesilkaya *et al.*, 2008), hecho que ratifica la predilección de neumococo en la colonización de ambientes ricos en mucina.

Una vez que el neumococo logra adherirse a células epiteliales, se promueven los eventos de internalización e invasión, con el objetivo de ganar acceso a sitios estériles del organismo. Se han descrito dos mecanismos de trans migración epitelial por parte de *S. pneumoniae*. El primero, se inicia por la unión de la molécula fosforilcolina (PCho) al receptor del factor activador de plaquetas (PAF-R) (Cundell *et al.*, 1995; Cundell *et al.*, 1996; Fillon *et al.*, 2006). PCho es un componente del ácido teicoico y lipoteicoico que se encuentran asociados a la pared celular bacteriana, y comparte homología estructural con el ligando fisiológico del PAF-R. Mediante la unión de PCho a PAF-R, el neumococo puede ingresar en la célula siguiendo la vía de reciclaje del receptor (Radin *et al.*, 2005; Ishizuka *et al.*, 2001). Se demostró que ratones carentes de PAF-R o ratones salvajes tratados con antagonistas del ligando fisiológico, son resistentes a neumonía, sepsis y meningitis cuando se los infecta con neumococo (Radin *et al.*, 2005; Rijneveld *et al.*, 2004; Grigg, 2012). Estos resultados indican que PAF-R es importante para la progresión de la infección a una enfermedad. Por otra parte, la activación de células endoteliales vasculares con trombina o

TNF-1 produce un incremento sustancial en la internalización de neumococo. Este fenómeno se asoció a un incremento en la expresión de PAF-R, dependiente de trombina o TNF-1 (Cundell *et al.*, 1995). El segundo mecanismo involucra la unión de la PspC (o también conocida como CbpA) a la porción extracelular del receptor de inmunoglobulina epitelial (PIgR), también conocida como “componente secretorio” (Elm *et al.*, 2004; Elm *et al.*, 2004; Kaetzel, 2001). Se demostró que la expresión de PspC es un factor importante para la colonización y la enfermedad invasiva por *S. pneumoniae*, aunque su efecto sobre la virulencia puede variar entre cepas (Brock *et al.*, 2002; Hammerschmidt *et al.*, 2000; Kerr *et al.*, 2006). Además, PspC une ácido siálico y lacto-N-tetrosa de la superficie de células epiteliales respiratorias, lo cual también demostró facilitar la colonización (Rosenow *et al.*, 1997). Después de la adhesión a la célula hospedadora, neumococo utiliza la vía de reciclaje de pIgR, análoga a la vía del PAF-R, para ser transportado entre las membranas apical y basal de la célula epitelial (Asmat *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2000). La cantidad de PIgR en la superficie celular se correlaciona con el grado de adhesión e invasión de neumococo, existiendo un gradiente decreciente desde el tracto respiratorio alto hacia el bajo, lo cual es opuesto al patrón observado para PAF-R (Mestecky *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2000). En consecuencia, se postula que el receptor PIg funciona como un receptor de neumococo en la nasofaringe y también en el endotelio microvascular del cerebro (Lu *et al.*, 2003; Iovino *et al.*, 2014), mientras que PAF-R actúa en la adhesión e invasión al epitelio pulmonar (Zhang *et al.*, 2000). Una vez que neumococo se une a la superficie de las células hospedadoras, se activan vías de señalización en respuesta a componentes bacterianos. Estas cascadas de señalización implican una gran variedad de efectores corriente abajo y pueden ser acopladas o desacopladas a proteína G. (Radin *et al.*, 2005; Iovino *et al.*, 2013).

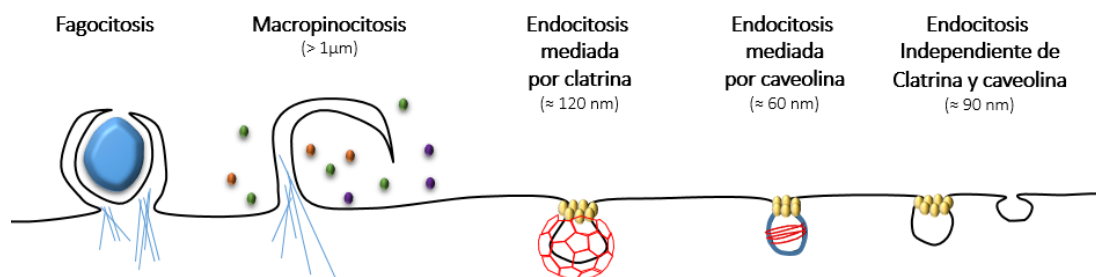
Mecanismos de internalización: endocitosis y fagocitosis

La membrana plasmática de las células eucariotas constituye un límite dinámico que separa el citoplasma del ambiente circundante (Conner *et al.*, 2003). Los iones y moléculas pequeñas, tales como azúcares y aminoácidos pueden atravesar fácilmente la membrana plasmática a través de complejos de proteínas transmembrana que están incrustados en la bicapa y que forman canales y bombas, mientras que el transporte de macromoléculas y complejos moleculares requiere un proceso diferente de internalización. En este caso, los compuestos son transportados dentro de la célula como vesículas que se forman a partir de la invaginación de ciertos dominios de membrana hacia el lado interno de la membrana plasmática. La internalización se divide en dos tipos principales: la fagocitosis y la endocitosis (Conner *et al.*, 2003) (**Esquema 5**).

El proceso de **fagocitosis** se limita a una clase limitada de células incluyendo macrófagos, monocitos y neutrófilos, y por lo general se utiliza para eliminar agentes patógenos y los restos de células muertas. 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 (Conner *et al.*, 2003; Cossart, 2004). 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.

En contraste a la fagocitosis, la **endocitosis** es un proceso común a todos los tipos de células (Nichols *et al.*, 2001) con excepción de los glóbulos rojos. Este proceso es una vía clásica de internalización de partículas pequeñas, aunque recientemente se ha descrito la internalización de objetos más grandes incluyendo bacterias (Veiga *et al.*, 2005; Cossart *et al.*, 2008). En base a los mecanismos moleculares la endocitosis se clasifica en: endocitosis *dependiente de clatrina*; *dependiente de caveolina*; *independiente de clatrina y caveolina* (dependiente o independiente de microdominos de lípidos) y *macropinocitosis*.

Macropinocitosis comparte similitudes con la fagocitosis y en particular utiliza vías de señalización mediadas por GTPasas que estimulan eventos de polimerización/ depolimerización de actina (Conner *et al.*, 2003; Ridley, 2001). En este proceso se forman ondulaciones de la membrana que colapsan y se fusionan con la membrana plasmática. De esta manera se forma un macropinosoma que es de mayor tamaño que las vesículas endocíticas normales. Mientras que en la endocitosis clásica requiere de la actividad de dinamina para la fision de la vesícula, el macropinosoma es escindido de la membrana plasmática de manera independiente de dinamina (Pelkmans *et al.*, 2003).



Esquema 5. Diferentes mecanismos de ingreso de material dentro de la célula.

Las vías endocíticas difieren respecto al tamaño y naturaleza del cargo, como así también de los mecanismos involucrados en la formación de la vesícula.

La endocitosis *dependiente de clatrina* y la endocitosis *dependiente de caveolina* se caracterizan por la formación de vesículas recubiertas con clatrina o caveolina respectivamente. Estos complejos de cubierta se ensamblan en estrecha asociación con la membrana plasmática formando un andamio rígido y curvado. Finalmente, dinamina escinde la vesícula endocítica de la membrana plasmática (Henley *et al.*, 1998). En la mayoría de las células eucariotas la endocitosis mediada por clatrina es una importante ruta de ingreso e internalización de bacterias, virus o toxinas (Duncan *et al.*, 2002; Rohde *et al.*, 2003). Por ejemplo, *Listeria monocytogenes* o *Escherichia coli enteropatogénica* (EPEC) secuestran un conjunto de proteínas endocíticas para promover la internalización bacteriana y formación de los pedestales de actina, respectivamente (Pizarro-Cerda *et al.*, 2010; Veiga *et al.*, 2007; Humphries *et al.*, 2013), haciendo uso de la endocitosis mediada por clatrina como medio de entrada a la célula infectada. Asimismo gran cantidad de virus hacen uso del ingreso via clatrina o caveolina: influenza, papilomavirus, virus respiratorio sincicial, entre otros (Sun *et al.*, 2013; Raff *et al.*, 2013; Gutierrez-Ortega *et al.*, 2008). Se ha descrito el ingreso de *S. pneumoniae* a las células epiteliales y endoteliales a través de mecanismos dependientes tanto de clatrina, como caveolina (Gradstedt *et al.*, 2013; Asmat *et al.*, 2014).

Los eventos endocíticos también pueden ocurrir sin la intervención de proteínas de cubierta en las vesículas en formación. Este mecanismo aún no ha sido completamente caracterizado y se

refiere como *endocitosis independiente de clatrina y caveolina* (Le Roy *et al.*, 2005). En este caso, la formación de invaginaciones a nivel de la membrana plasmática es impulsada únicamente por la composición lipídica de ciertas regiones de la membrana. Estas estructuras no requieren ninguna proteína de andaminaje y en algunos casos se asocian con microdominios de lípidos que pueden requerir o no dinamina (Nichols *et al.*, 2001; Cossart *et al.*, 2010; Vadia *et al.*, 2011).

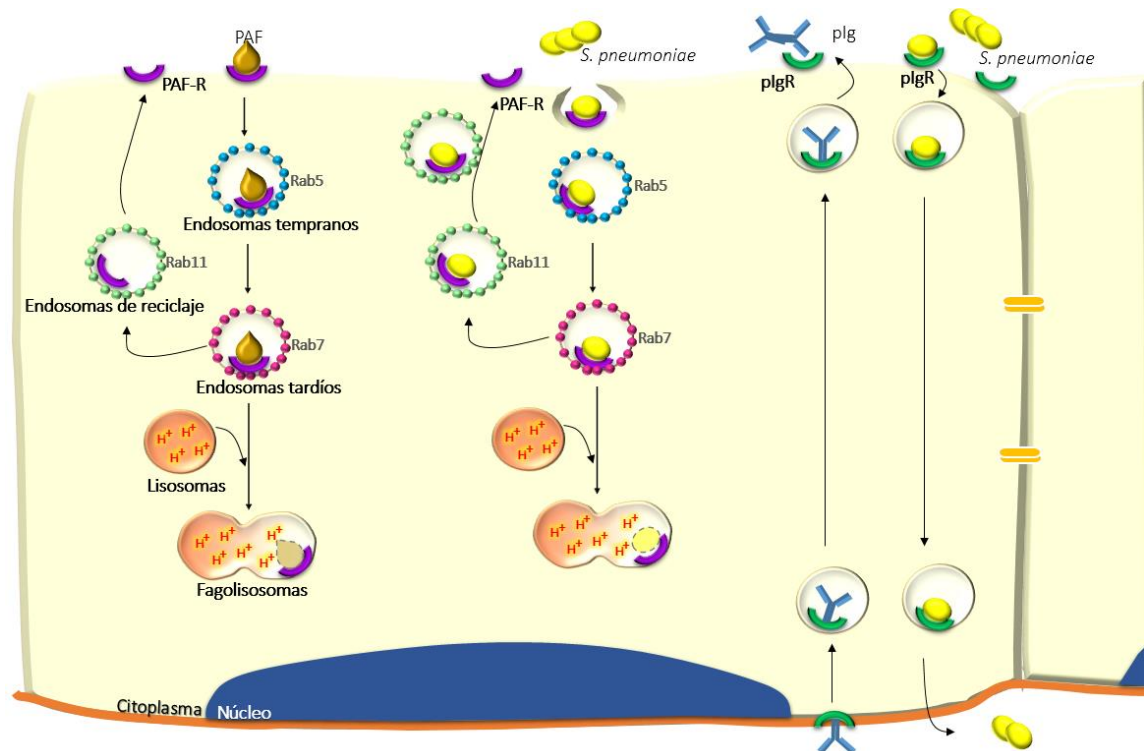
Para establecer una infección, los microorganismos patógenos han desarrollado diversas estrategias para burlar las defensas del huésped y explotar su maquinaria celular. Dependiendo del patógeno en particular, los factores de virulencia pueden desactivar o revertir las vías de tráfico vesicular hacia o desde la superficie de la célula, promoviendo su ingreso, replicación o escape. Distintas bacterias ingresan en las células no fagocíticas a través de la activación de mecanismos de cierre (“*zipper*”) o de gatillo (“*trigger*”). En ambos casos, la alteración de la vía endocítica desencadena una cascada de acontecimientos que conducen a la polimerización de actina y a la reorganización/reordenamiento del citoesqueleto, lo cual permite el ingreso de la bacteria. Posteriormente, estas últimas se internalizan en una vacuola, también conocido como un fagosoma.

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 *et al.*, 2011). En las infecciones bacterianas, las proteínas Rab desempeñan una función esencial en la inmunidad del huésped, internalización por endocitosis o fagocitosis y direccionamiento del transporte de los patógenos fagocitados hacia los lisosomas para su degradación. Comunmente, 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.

Endocitosis en la infección por *S. pneumoniae*

La endocitosis mediada por clatrina es la ruta mejor caracterizada para el ingreso de neumococo. PAF-R media la internalización neumocócica que depende de β -arrestina como proteína adaptadora del entramado de clatrina (Radin *et al.*, 2005). Recientemente, se ha descrito la internalización mediante otra vía diferente que involucra a caveolina-1 (Gradstedt *et al.*, 2013; Asmat *et al.*, 2014). Mediante microscopía electrónica de células A549 infectadas con neumococo, se observó la presencia de la bacteria dentro de vacuolas intactas y de forma libre, en el citoplasma de células dañadas (Talbot *et al.*, 1996). En el ingreso de la bacteria participan algunas de las proteínas Rab involucradas en diferentes estadios de maduración de las vesículas endocíticas. Estudios de la vía endocítica en células de epitelio capilar de cerebro de rata (rBCEC6) dentro de los 15 a 60 min posteriores a una infección con neumococo, muestran que: (i) un 48-56% de las bacterias internalizadas colocalizan con Rab5 y EEA1 (marcadores de endosomas tempranos); (ii) un 37-43% colocaliza con Rab7 y LAMP1 (marcadores de endosomas tardíos); y (iii) un 16-24% de colocaliza con el marcador de reciclaje Rab11 (Radin *et al.*, 2005) (**Esquema 6**). Se ha descrito en cultivos polarizados de células de endotelio cerebral humano (*células BMEC*) infectados con

neumococo, que las bacterias pueden tomar tres tipos de destinos diferentes luego de acceder por el lado apical de la monocapa. Mientras que una población transmigró exitosamente hacia la cara basolateral de la célula hospedadora, una pequeña cantidad salió nuevamente por la cara apical de las células utilizando una vía de reciclaje y el resto murió en los lisosomas (Ring *et al.*, 1998). Por otro lado, cuando el ingreso de la bacteria es mediado por PspC, su interacción específica con el plgR humano participa en la vía endocítica, la cual requiere caveolina, clatrina y dinamina (Agarwal *et al.*, 2010). Asimismo, el destino intracelular involucra el tráfico por los endosomas tempranos (Rab5), tardíos (Rab7), reciclaje (Rab11 y Rab4) y lisosomas (LAMP-1). Recientemente, se confirmó que neumococo también puede realizar transcitosis desde la cara apical de la célula hacia la basal, mediada por plgR/PspC (Asmat *et al.*, 2014).



Esquema 6. Mecanismos de ingreso de *S. pneumoniae* en células epiteliales.

Estrategia empleada por neumococo para su internalización a través de la interacción con ciertos receptores celulares, simulando al ligando fisiológico. Una de estas vías es la del PAF-R, cuyo ingreso es mediado por clatrina diferentes proteínas adaptadoras, como β -Arrestina. La segunda ruta de entrada es a través del transporte inverso del plgR. Este receptor transporta Ig poliméricas (IgM e IgA) desde la cara basal a la apical del epitelio, en un mecanismo denominado transcitosis. Neumococo se une al receptor, a través de PspC, expresado en la superficie bacteriana y logra eludir los mecanismos de defensa del huésped, eludiendo los mecanismos de defensa del hospedador.

Mecanismo de autofagia en las infecciones bacterianas.

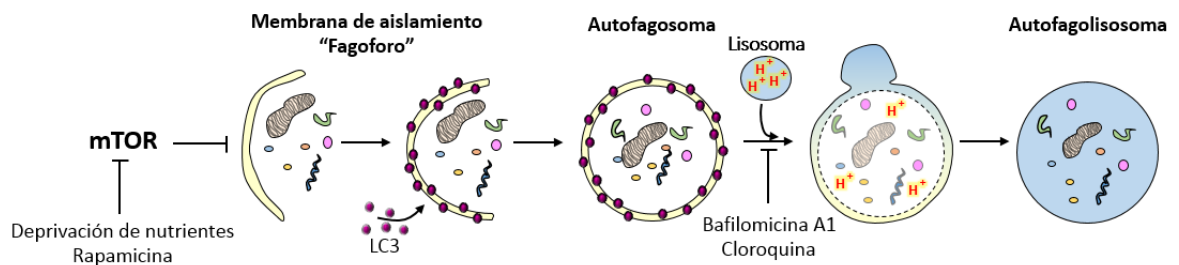
La macroautofagia (de aquí en más: autofagia) es una vía celular que dirige a proteínas y organelas hacia los lisosomas para su degradación. Este proceso se produce a un nivel basal en condiciones ricas en nutrientes y se encuentra exacerbada en respuesta a diversas condiciones de estrés celular, tales como la privación de nutrientes. La autofagia puede ser selectiva o *no selectiva*. A su vez la autofagia selectiva puede clasificarse en autofagia orgánulo-específica o xenofagia. El primer caso se refiere los blancos son organelas celulares y se denomina mitofagia para mitocondrias, peroxifagia para peroxisomas y reticulofagia para retículo endoplásmico. En

cambio la xenofagia se encuentra direccionada a los microorganismos (Klionsky *et al.*, 2014). Este proceso se encuentra altamente regulado, desde su comienzo hasta su finalización, por el grupo de proteínas Atg (relacionados a la autofagia) (Ohsumi, 2001). Dos sistemas de conjugación del tipo ubiquitina, Atg5-Atg12 y Atg8-fosfatidiletanolamina (PE) o también llamado LC3, son esencial para el inicio de la formación del autofagosoma (Cao *et al.*, 2007). Atg8 tiene un homólogo en los mamíferos, la cadena liviana 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1 (MAP1), o simplemente LC3, que se considera uno de los marcadores más fiables de la autofagia (Kabeya *et al.*, 2000). La proteína soluble LC3 se distribuye inicialmente en el citosol. Después de ser escindida por la proteasa de cisteína Atg4, se convierte en LC3-I, que posteriormente se conjuga con fosfatidiletanolamina en la superficie de la membrana autofagosoma. Esta conjugación LC3-fosfatidiletanolamina se denomina LC3-II, y se requiere para el cierre de la membrana de aislamiento y la fusión de los autofagosomas con los lisosomas (Kabeya *et al.*, 2000).

Frente a estímulos que inducen un incremento de autofagia, tienen lugar dentro de la célula una serie de reordenamientos de membrana que conducen al aislamiento de ciertas partes del citoplasma, dentro de las llamadas “membrana de aislamiento” o “fagoforo” (**Esquema 7**). Estas membranas se alargan y rodean al objetivo, generando la estructura característica de doble membrana denominada “autofagosoma” (Mizushima *et al.*, 2007), cuyo tiempo de formación consta de sólo 5-10 min (Mizushima *et al.*, 2001). Luego, el autofagosoma recluta a LC3-II y proteínas de la membrana lisosomal como la la H⁺-ATPasa y LAMP1, convirtiéndose así en un autofagosoma tardío, carente de enzimas hidrolíticas. Finalmente, los autofagosomas tardíos se fusionan con los lisosomas, los cuales contienen proteasas ácidas, y forman el autofagolisosoma. De esta manera, los componentes celulares secuestrados son degradados dentro del autofagolisosoma, y los productos de descomposición resultantes se reciclan para la síntesis de nuevos componentes celulares (Dorn *et al.*, 2002). Esta reorganización dinámica de membranas permite degradar una cantidad relativamente grande de componentes citoplasmáticos al mismo tiempo, en contraste con el sistema ubiquitina-proteasoma, otro sistema principal de degradación enfocado en la degradación individual de proteínas ubiquitinadas (Welchman *et al.*, 2005).

Una de las funciones de la autofagia en la defensa celular es eliminar los patógenos invasores. Aunque generalmente las bacterias que invaden células a través de endocitosis son dirigidas hacia los lisosomas y degradadas allí, algunos de ellos logran evadir el mecanismo de defensa del huésped mediante el bloqueo o la alteración en la maduración del endosoma. Una vez en los endosomas, algunos patógenos escapan hacia el citosol y evitan su destrucción en los lisosomas (por ejemplo *Listeria* o *Shigella*), mientras que otros interfieren con la fusión entre endosomas-lisosomas y forman vacuolas replicativas (por ejemplo, *Salmonella* o micobacterias). Se ha descrito que la autofagia puede degradar patógenos intracelulares localizados tanto en el citosol (Ogawa *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2009) como en el interior de endosomas (Gutierrez *et al.*, 2004; Birmingham *et al.*, 2006). A lo largo de los años, la autofagia ha sido vista como parte vital de la respuesta inmune del huésped a la infección microbiana; sin embargo, su función debe ser considerada de una manera mucho más amplia en la respuesta del huésped a la infección, no sólo como una vía de eliminación de bacterias dentro de lisosomas (Levine, 2005; Levine *et al.*, 2007; Sanjuan *et al.*, 2008; Campoy *et al.*, 2009). Además de restringir la replicación bacteriana y favorecer

su eliminación, la autofagia también puede favorecer la supervivencia intracelular (Campoy *et al.*, 2009; Fedrigo *et al.*, 2011; Otto *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2005; Pizarro-Cerda *et al.*, 1998).



Esquema 7. Mecanismo de autofagia.

En la iniciación de la autofagia la membrana secuestrante denominada membrana de aislamiento o fagoforo forma una estructura preautofagosomal. El origen de la membrana es desconocido pero probablemente incluye el retículo endoplasmático y la vía secretoria temprana. El fagoforo envuelve citosol y el material a ser degradado; posteriormente se forma una vesícula de doble membrana, llamada vacuola autofágica o autofosoma. La forma conjugada de LC3 se localiza tanto en el interior como en el exterior de la membrana de aislamiento y sirve como único marcador de fagoforos y autofosomas. Este último al adquirir enzimas hidrolíticas por fusión con lisosomas genera un autofagolisosoma de simple membrana, permitiendo que el material sea degradado y reciclado.

En relación a la infección por *S. pneumoniae*, hasta el momento de escritura de este trabajo, no se han reportado antecedentes que vinculen la vía autofágica con los mecanismos intracelulares de esta bacteria. Debido a la gran cantidad de microorganismos relacionados a autofagia durante su estadio intracelular, resulta sumamente importante conocer y comprender también la implicancia de este proceso en la infección por neumococo.

Capítulo 4. Virus influenza A humano.

El término influenza deriva de la palabra italiana “*influentia*”, debido a que a mediados de 1300 se consideraba que la enfermedad 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 era debido a una infección bacteriana con *Haemophilus influenzae*. No fue hasta 1931 que Richard Shope mostró que la gripe porcina podría 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 sus colaboradores aislaron el virus de la gripe humana, asociado a enfermedades respiratorias (Hoyle *et al.*, 1937).

Estructura del virión

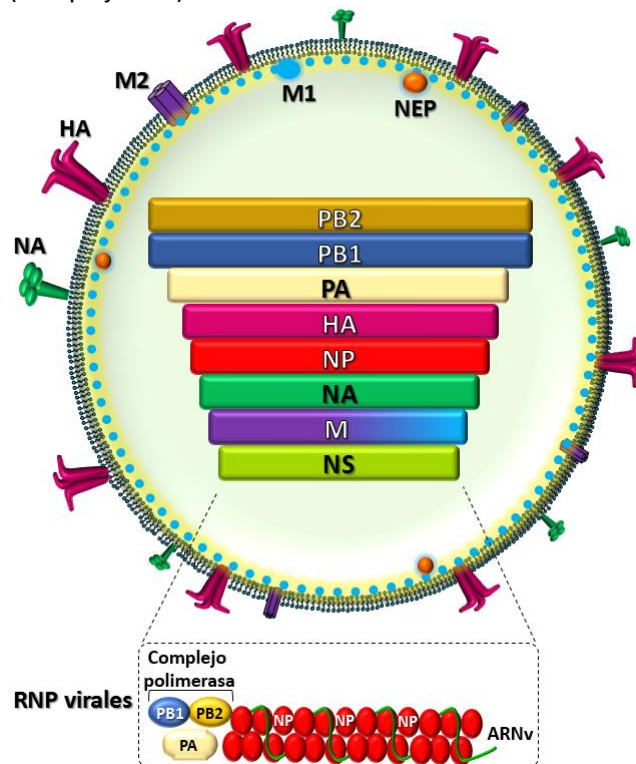
Los virus influenza son miembros de la familia Orthomyxoviridae, la cual comprende 5 géneros: *Influenza virus A*, *Influenza virus B*, *Influenza virus C*, *Thogotovirus* e *Isavirus*. Esta familia consta de virus envueltos, ARN segmentado, monocatenario, sentido negativo (ssARN). Cada virión contiene una ribonucleocápside helicoidal (también llamada vRNP por ribonucleoproteína viral). Los viriones de influenza son de forma esférica o alargada de 80-120 nm de diámetro (Fujiyoshi *et al.*, 1994). La envoltura viral consiste en una bicapa lipídica que contiene tres proteínas transmembrana: HA (hemaglutinina), NA (neuraminidasa), y M2 (canal de iones) en el exterior y M1 (proteína de la matriz) debajo de la membrana (**Esquema 8**). La bicapa lipídica del virus de la gripe consta de una estructura de mosaico conteniendo microdominios de lípidos enriquecidos en colesterol, derivadas de la membrana plasmática del hospedador (Scheiffele *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Nayak *et al.*, 2009). Por fuera de esa envoltura lipídica, se encuentran aproximadamente 500 proyecciones con forma de espículas/virión. **HA** es la proteína principal de la envoltura (~80%) y forma trímeros en la superficie, con sitios de unión al receptor y epítopes para anticuerpos neutralizantes. Es sintetizada en la célula infectada como una única cadena polipeptídica (HA₀), que posteriormente se escinde en dos subunidades, HA₁ y HA₂ (Lazarowitz *et al.*, 1973) que permanecen unidas covalentemente entre sí a través de enlaces disulfuro. Las dos subunidades se mantienen juntas en la superficie de la partícula de virus. El nuevo extremo amino(N)-terminal de HA₂ que se produce por la escisión, contiene una secuencia de aminoácidos hidrófobos llama péptido de fusión. Durante la entrada del virus en las células, el péptido de fusión se inserta en la membrana endosomal y provoca la fusión de las membranas viral y celular, es por esta razón que el clivaje proteolítico es esencial para la infectividad del virus.

NA es la segunda proteína de envoltura más abundante (~ 17%) y forma espículas tetraméricas. Una función importante de la proteína NA es eliminar el ácido siálico de las glicoproteínas. El ácido siálico está presente en muchas proteínas de la superficie celular, así como en las glicoproteínas virales; es el receptor de la célula a la que el virus de la gripe se une a través de la proteína HA. Es así que la inactivación de NA resulta en la formación de agregados de virus en la superficie celular (Palese *et al.*, 1974; Yondola *et al.*, 2011). Por consiguiente, esta enzima es esencial para la liberación de nuevas partículas de virus desde la superficie de una célula infectada, así como en la propagación y transmisión de virus de un huésped a otro. El desarrollo de nuevos fármacos diseñados para inhibir la liberación viral ha explotado esta característica esencial de NA

en la producción viral. Tanto Tamiflu® (oseltamivir) y Relenza® (zanamivir) son imitaciones estructurales de ácido siálico que se unen fuertemente en el sitio activo de la enzima NA, estableciendo una competencia con el ácido siálico de la superficie celular. El resultado es una inhibición de la infección por el virus porque los viriones no pueden propagarse de una célula a otra.

La tercera proteína de envoltura **M2** es un componente menor (~16-20 moléculas / virión) y funciona como canal de iones (Lear, 2003; Wu *et al.*, 2003). Esta proteína, forma canales iónicos y juega un papel importante en la liberación del material genético del virión. M2 media la acumulación de iones H⁺ desde el endosoma hacia la partícula viral, resultando en el debilitamiento de la interacción entre las ribonucleoproteínas y la proteína M1 de la matriz (Martin *et al.*, 1991; Pinto *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011).

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 (complejo 3P).



Esquema 8. Estructura del virus influenza A humano.

El genoma de IAV consiste en 8 segmentos de ARN que codifican de 11 a 16 proteínas. Estas son: Proteína Nuclear de Exportación (NEP; también conocido como NS2) y la proteína antagonista de la respuesta antiviral del huésped, proteína no-estructural 1 (NS1), que están codificadas por el segmento NS; la proteína de la matriz M1 y el canal iónico M2, que son codificadas por el segmento M; la proteína de unión al receptor, hemaglutinina (HA), la enzima neuraminidasa responsable del clivaje de ácido siálico (NA), la nucleoproteína (NP), y los componentes del complejo de ARN dependiente de ARN polimerasa (PB1, PB2 y PA), expresado a partir de su respectivos segmentos genómicos; y la proteína PB1-N40 que se expresa desde el segmento PB1 y tiene una función desconocida. Además, algunos virus expresan la proteína pro-apoptótica PB1-F2, que está codificada por un segundo ORF en el segmento PB1. Dentro del virión, cada uno de los ocho segmentos virales forma una ribonucleoproteína viral (complejo RNP) donde el ARN viral se envuelve alrededor de NP, y se une al complejo de la polimerasa viral.

Clasificación, reservorio y huéspedes

Hay tres géneros o tipos de virus de la gripe, influenza A, B y C, distinguibles en base a diferencias antigénicas entre las proteínas de matriz y las nucleoproteínas (M y NP). Los tipos difieren en el rango de huéspedes, la variabilidad de la glicoproteínas de superficie, la organización del genoma y la morfología. De los tres tipos de influenza, sólo IAV e IBV causan epidemias en humanos, mientras que IAC sólo causa enfermedades esporádicamente. Aún así, ciertas cepas de IBV han sido aisladas de ballenas y cerdos e ICV también ha sido aislado a partir de perros (Osterhaus *et al.*, 2000; Ran *et al.*, 2015; Beeler, 2009).

IAV se divide en subtipos, en base a la naturaleza de sus glicoproteínas de superficie, HA y NA. Hay 18 HA diferentes y 11 NA que se distinguen estructural y antigénicamente es decir, los anticuerpos para un subtipo de virus no reaccionan contra otro (Dugan *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2014; Obenauer *et al.*, 2006). 16 HA y 9 NA han sido encontrados en huéspedes aviares, en diferentes combinaciones, por ejemplo H1N1, H3N2. Todos los subtipos virales circulan entre las aves acuáticas, aunque sólo algunos han sido identificados en los seres humanos. Durante el siglo pasado, las pandemias de IAV se han producido en 1918, 1957 y 1968 a raíz de la aparición de los subtipos H1N1, H2N2 y H3N2, respectivamente. La primera pandemia de este siglo se produjo en 2009 y surgió de un subtipo de origen porcino (Smith *et al.*, 2009). Asimismo, también se han descrito infecciones humanas con IAV provenientes de aves, incluyendo el H5N1, H7N7 y H9N2. Sin embargo, hasta la fecha estos subtipos no han adquirido la capacidad de transmitirse de manera eficiente en la población humana (Suzuki, 2005). Los virus influenza A son conocidos por infectar gran variedad de otros mamíferos, incluidos los primates no humanos, cerdos, caballos, gatos, focas, ballenas y visones (Webster *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 2014).

Los virus influenza son patógenos importantes desde una perspectiva de salud pública, debido a que son la causa más común de enfermedad respiratoria humana. De manera significativa, las infecciones de gripe se asocian con una alta morbilidad y mortalidad, sobre todo en personas de edad avanzada, los niños y las personas con enfermedades crónicas (Dierig *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014). Los programas de vacunación anual previenen las infecciones de influenza, inmunizando con virus vivos atenuados o inactivados, y actualmente la formulación de dichas vacunas incluye una mezcla de subtipos H3N2, H1N1 e IBV. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las epidemias anuales de influenza son las responsables de 3-5 millones de casos de infecciones respiratorias severas y de 200-500 mil muertes por año, solo contando los casos reportados en países desarrollados (Stohr, 2003). El impacto de infecciones respiratorias o muertes asociadas con influenza en países en desarrollo no está suficientemente documentada, aunque se presume que las tasas de morbilidad y mortalidad son similares o mayores que los reportados en países desarrollados.

Genoma viral y mutaciones

El genoma de IAV se compone de 8 segmentos y contiene aproximadamente 14000 nucleótidos. Los segmentos están compuestos de RNA lineal, simple cadena de sentido negativo, y contiene de 10 a 11 marcos de lectura abierta (ORFs) (Szewczyk *et al.*, 2014). Historiacamente, se asignaron los siguientes productos génicos a los segmentos:

Segmentos ARN viral y proteínas que codifican	
Segmento ARN (Nº de nucleótidos)	Producto génico (Nº de aminoácidos)
1 (2341)	Polimerasa PB2 (75)
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 (1413)	Neuraminidasa (454)
7 (1027)	Proteína de matriz M1 (252)
	Proteína de matriz M2 (97)
8 (890)	Proteínas no-estructurales
	NS1 (230)
	NEP o NS2 (121)

Los 3 segmentos más grandes contienen los genes que codifican para el complejo polimerasa, responsable de la replicación y la transcripción viral; está conformado por PB2, PB1 y PA (Steinhauer *et al.*, 2002) y se encuentran en viriones estrechamente asociados con el ARN. Estas polimerasas tienen actividad endonucleasa. Otros dos genes codifican las proteínas de la envoltura viral, HA y NA, las cuales juegan un rol crucial en la interacción entre el virus, la célula hospedadora y el sistema inmune del individuo. Dos genes del mismo segmento codifican a dos proteínas que forman la cápside (M1 y M2). Las otras proteínas son NS1 y NS2, que tienen función reguladora de la síntesis de los componentes virales en la célula infectada. NS1 es un determinante de virulencia en las células hospedadoras y está vinculado en la evasión de las respuestas antivirales en la célula huésped (Jackson *et al.*, 2008). Aunque NS2 fue originalmente considerada ausente en las partículas virales (de ahí el nombre "no estructurales"), posteriormente fueron encontradas en un bajo número de copias. NS1 no está presente en los viriones, pero es abundante en las células infectadas. En los comienzos de este siglo se describieron nuevos productos génicos. La proteína PB1-F2, descubierta en 2001, está codificada por un marco de lectura abierto cerca del extremo 5' del gen PB1 (Chen *et al.*, 2001). Es un pequeño polipéptido, de alrededor de 90 aa, que se encuentra sólo en algunas cepas de la gripe A. Aparentemente, esta proteína es inductora de la actividad proapoptótica y contribuye en la patogénesis viral en ratones (Zamarin *et al.*, 2006), su efecto en la muerte celular es específico del tipo celular (Chen *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2004) y de la cepa viral (McAuley *et al.*, 2010). PB1-F2 no tiene actividad polimerasa, de manera similar al tercer polipéptido codificado por el segmento PB1, llamado PB1-N40 (Wise *et al.*, 2009). El virus que carece de PB1-N40 tiene una tasa de replicación más lenta, sin embargo, aún no se esclareció un rol más detallado para esta proteína. Se han identificado un polipéptido dentro del segmento genómico 3, PA-X, codificado por un marco de lectura alternativa en PA (Jagger *et al.*, 2012). PA-X

modula la respuesta del huésped y la virulencia viral (Schrauwen *et al.*, 2014). Se expresa en la mayoría de las cepas, aunque a un nivel bajo. Últimamente, se han descrito dos formas truncadas de la subunidad de la polimerasa PA: PA-N155 y PA-N182, los cuales no muestran actividad polimerasa (Muramoto *et al.*, 2013); sin embargo, la ausencia de estos polipéptidos en cepas mutantes, refleja menor eficiencia en la replicación y son menos patogénicos que los virus de tipo salvaje en modelos murinos.

Evolución de IAV

Los virus influenza acumulan mutaciones puntuales durante la replicación, debido a que su complejo de la ARN polimerasa no tiene actividad de corrección de pruebas. Sus genes tienen altas tasas de mutación (que van desde aproximadamente 1×10^{-3} a 8×10^{-3} sustituciones/sitio/año) (Chen *et al.*, 2006). Cada ciclo de replicación puede introducir más de una de mutación por genoma replicado; por ejemplo, la HA del virus influenza está sujeta a una sustitución de bases por generación viral (Webster *et al.*, 1992). Estas mutaciones pueden tener un efecto neutral, negativo o positivo en la viabilidad del virus. Las mutaciones que cambian los aminoácidos en las porciones antigénicas de las glicoproteínas de la superficie pueden producir ventajas selectivas, lo que les permite evadir la inmunidad preexistente. La molécula de HA inicia la infección mediante la unión a receptores específicos en las células hospedadoras. Los anticuerpos contra la proteína HA impiden la unión al receptor y son eficaces en la prevención de re-infección con la misma cepa (este es el fundamento de las vacunas contra influenza). HA y NA pueden evadir la inmunidad adquirida previamente mediante dos mecanismos: cambio y deriva antigénica.

La *deriva antigénica*, es decir los cambios graduales en la antigenicidad de estas dos proteínas, puede finalmente conducir a la creación de variantes virales que ya no son reconocidos y neutralizados por anticuerpos producidos contra la cepa parental. Por lo tanto, estas nuevas variantes antigénicas pueden causar epidemias. Estas variantes son generalmente cepas dominantes en las poblaciones humanas o animales durante unos años y luego son reemplazados por nuevas variantes antigénicas. Aunque este fenómeno es más evidente para la hemaglutinina y la neuraminidasa, obviamente, otros genes se someten a los mismos cambios graduales, causados por la actividad de una polimerasa propensa a errores. En los *desplazamientos antigénicos* se producen cambios mucho más abruptos en el contenido del genoma. Este fenómeno se puede definir como el reordenamiento de segmentos de genes virales que ocurren cuando una misma célula es coinfectada con dos variantes genómicas diferentes de virus de influenza A. Esta combinación suele tener lugar en especies animales infectados con cepas de diferente origen, por ejemplo, cepas aviares y humanas. Después del intercambio de segmentos genómicos, nuevas cepas con propiedades drásticamente modificadas podrán establecerse en la población. Los cambios antigénicos principales en hemaglutinina o neuraminidasa pueden resultar en una abrupta aparición de nuevas cepas, que no son reconocidas por el sistema inmunológico humano o de animales y pueden dar lugar a pandemias. La aparición de una cepa viral con un nuevo HA en la circulación humana ha sido la causa de las dos últimas pandemias de gripe (en 1957 y 1968); en ambos casos, el virus humano pospandémico importó una HA de un virus previamente circulante no identificado, aviar o de tipo aviar (Scholtissek *et al.*, 1978).

Mecanismo de infección de IAV

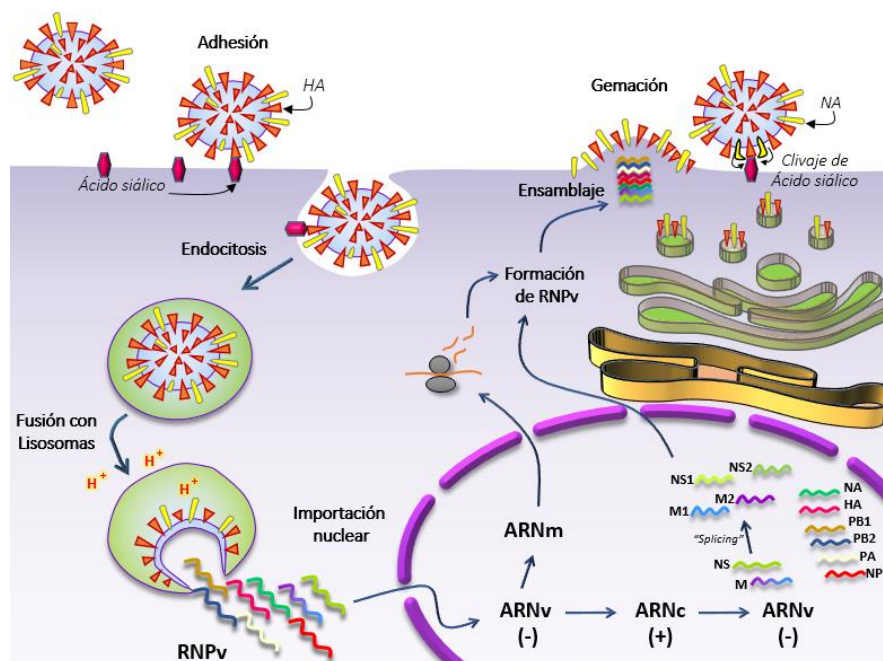
El virus influenza A (IAV) es el principal agente etiológico de epidemias y pandemias en los seres humanos, donde la infección se restringe predominantemente al tracto respiratorio ((Taubenberger *et al.*, 2008)). La infección de las células epiteliales respiratorias se inicia luego del reconocimiento de ácido siálico (ácido N-acetil neuramínico) en la superficie celular, por medio de la hemaglutinina viral (HA) (Skehel *et al.*, 2000). 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 (Matrosovich *et al.*, 1997; Wilks *et al.*, 2012). La unión de ácido siálico en los residuos galactosa α -2,6 es mayormente encontrada en la tráquea humana, mientras que el ácido siálico en posición α -2,3 es principalmente encontrado en el epitelio intestinal de aves. Este hecho explica la preferencia particular de los diferentes subtipos virales hacia huésped, aunque no da una especificidad absoluta. Puede ser eludido por alto inóculo viral (como fue el caso con la mayoría de las infecciones de humanos con gripe H5N1) o por unas pocas mutaciones puntuales en el gen de la hemaglutinina.

Luego de la unión al receptor, el virus es internalizado (**Esquema 9**). El mecanismo principal es la endocitosis mediada por clatrina, aunque la vía independiente de clatrina y caveolina también ha sido descrito en la entrada de IAV a la célula (Lakadamyali *et al.*, 2004; Grove *et al.*, 2011). El pH ácido del compartimiento endosomal conlleva a un cambio conformacional en HA, que facilita la fusión de la membrana del virus con la membrana del endosoma, la liberación de las ribonucleoproteínas (RNPs) en el citoplasma y su subsecuente transporte al núcleo. HA se sintetiza en la célula infectada como una única cadena polipeptídica (HA₀) con una longitud de aproximadamente 560 residuos de aminoácidos, que posteriormente se escinde en dos subunidades, HA₁ y HA₂. Estas subunidades permanecen unidas covalentemente entre sí a través de enlaces disulfuro. La escisión de HA₀ es esencial para la infectividad, y la naturaleza del sitio de clivaje es un determinante de virulencia para el virus influenza. Durante el ingreso, los viriones deben inducir ciertas cascadas de señalización para facilitar el tráfico exitoso a través de la vía endocítica (Elbahesh *et al.*, 2014). Como consecuencia de estos procesos, el contenido del virión, su material genético en forma de complejo de ribonucleoproteínas, se liberan en el citoplasma de la célula (Stegmann, 2000; Sieczkarski *et al.*, 2005). La apertura del canal iónico M2 en el pH ácido del endosoma, acidifica el interior del virión y debilita la interacción de RNPv con la proteína M1 (Martin *et al.*, 1991; Pinto *et al.*, 2006). Recientes hallazgos sugieren que los ocho segmentos de ARN se transportan como una única molécula hacia el núcleo (Chou *et al.*, 2013).

La mayoría de virus con genomas segmentados y de sentido negativo se replican en el citoplasma (codifican sus propias enzimas para la transcripción); sin embargo, el virus influenza replica en el núcleo celular, y utiliza la RNA polimerasa II celular, dependiente de ADN, aunque esta enzima no transcriba su genoma. El virus genera dos tipos de ARN de sentido positivo: un RNAm y una plantilla para la replicación (RNA antígenómico). Los ARN viral de sentido negativo se transcriben a ARN mensajeros de sentido positivo (ARNm) por medio de la transcriptasa inversa (que consiste en PB1, PB2 y PA) transportada con las RNP. La transcriptasa, en un proceso denominado "cap-snatching" (Plotch *et al.*, 1979; Bouloy *et al.*, 1979; Krug, 1981; Koppstein *et al.*,

2015), utiliza regiones cortas de ARNm de la célula como cebadores para la iniciación de la síntesis de ARNm viral. Estas regiones “cap” son necesarias para una unión eficaz de los ribosomas al ARNm. De esta forma, el virus inhibe 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.

Los ARN virales de sentido negativo también sirven como moldes para la producción de copias exactas de ARN de sentido positivo (ARNc), que a su vez dirigen la síntesis de nuevas copias de ARN viral de sentido negativo. Estos segmentos genómicos se ensamblan con NP y subunidades de polimerasas para formar los complejos RNP que serán transportados de vuelta al citosol para el ensamblaje de las nuevas partículas virales. En este proceso, las proteínas M1 y NS2 (también llamada proteína de exportación nuclear-NEP) desempeñan un papel vital en la translocación de estas estructuras macromoleculares (O'Neill *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001).



Esquema 9. Ciclo de replicación del IAV.

Por medio de la unión de la hemaglutinina (HA) viral a un receptor que contiene ácido siálico se produce la entrada viral mediante la formación de una vesícula endocítica. El pH ácido del lumen endosomal induce la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma durante el tráfico endocítico hacia los lisosomas. Este evento produce la liberación de los complejos Ribonucleoproteína viral (RNPv) que son transportados al núcleo para comenzar la replicación del ARN viral (ARNv), y la transcripción de los ARN mensajeros (ARNm) a partir de los ARNv. Posteriormente ocurre la síntesis de proteínas de superficie e inserción de las mismas en la membrana citoplasmática, la exportación de los RNPv neoformados hacia el citoplasma y el ensamblaje. Para la liberación de la nueva partícula viral es fundamental la actividad de la neuraminidasa (NA), ya que cliva los residuos de ácido siálico que mantienen el virión unido a la célula infectada.

Finalmente, las proteínas de la envoltura (HA, NA, M2), la proteína de la matriz (M1) y las RNPv (que contienen RNAsc, NP, PA, PB1, PB2 y NEP) son transportadas al lugar de montaje en la membrana plasmática, para formar parte de las partículas virales que son liberadas al exterior celular. Se ha postulado que el ensamblaje de los componentes virales ocurre preferencialmente en los dominios de balsa lipídica (Nayak *et al.*, 2004; Leser *et al.*, 2005; Rossman *et al.*, 2011). Ambas glicoproteínas, neuraminidasa y hemaglutinina, tienen afinidad por ácido siálico, pero poseen efectos opuestos en la liberación del virus de las células. HA ancla el virus a la membrana celular debido a su interacción con los receptores que contienen ácido siálico. Se requiere NA para eliminar

el ácido siálico, a fin de permitir al virus abandonar sus células hospedadoras. Por lo tanto, debe haber un equilibrio riguroso entre las actividades de estas dos glicoproteínas, para llegar a obtener la máxima producción viral.

Autofagia en la infección con IAV

La autofagia es un mecanismo que permite la supervivencia celular bajo condiciones de estrés, tales como deprivación de aminoácidos, estrés del retículo endoplásmico, hipoxia, señalización mediada por especies reactivas de oxígeno (Huang *et al.*, 2011) o infecciones causadas por virus o bacterias (Dumit *et al.*, 2012), entre otros. Los virus han desarrollado diversas estrategias ya sea para contrarrestar la autofagia o para emplearla en beneficio propio (Dumit *et al.*, 2012; Deretic *et al.*, 2009). A diferencia de otros virus de ARN que pueden utilizar los autofagosomas como un sitio de replicación, el virus de la gripe conserva su sitio de replicación nuclear-citoplásmico, a pesar de la activación y modulación de la autofagia en la célula infectada.

Una de las proteínas de influenza que posee un rol central en la modulación autofágica hacia la infección es a proteína de matriz M2. Funciona como un canal iónico selectivo de protones y es responsable de la acidificación del núcleo viral en el proceso de endocitosis, permitiendo la liberación del genoma viral y proteínas asociadas en el citoplasma (Pinto *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la expresión de M2 es suficiente para inducir los pasos iniciales de la formación de autofagosomas (Zhou *et al.*, 2009; Gannage *et al.*, 2009; Zhirnov *et al.*, 2013), mientras que otras proteínas de influenza, incluyendo PB1, PA, PB2, NP, NEP, NS1, M1, y NA, no pueden hacerlo por sí mismas. La inducción de autofagia es consecuencia del incremento en la síntesis de M2 y HA, de manera dependiente de NS1 (Zhirnov *et al.*, 2013).

Asimismo, se ha visto que M2 es esencial en el bloqueo de la maduración normal de los autofagosomas, impidiendo su fusión con los lisosomas (Zhou *et al.*, 2009; Gannage *et al.*, 2009; Zhirnov *et al.*, 2013). En general, las proteínas virales revierten la fisiología de la célula hospedadora mediante la codificación de motivos lineales cortos (*SLiMs*, “*Short Linear Motifs*”) que imitan las interacciones de las proteínas del huésped (Davey *et al.*, 2011). Recientemente, se describió en IAV la existencia de un *SLiM* mediante el cual asemeja la interacción proteína-proteína del huésped, denominado motivo LIR. Los motivos LIR (“*LC3-interacting región*”) poseen una estructura de “lámina β” que forman un domino “hoja β” de unión intermolecular con LC3 (Johansen *et al.*, 2011). Estos motivos están presentes en el tallo citoplasmático de M2 (Beale *et al.*, 2014), y promueven la interacción directa entre M2 y LC3. Durante la gemación viral, dicha interacción causa la relocalización de LC3 hacia la membrana plasmática de células infectadas con IAV, resultando esencial para generar estabilidad en la progenie viral, sin influenciar la acumulación perinuclear de LC3 (Beale *et al.*, 2014). A nivel molecular, también se ha visto que el bloqueo de la autofagia es consecuencia de la unión de M2 a Beclina-1, una de las proteínas requeridas para la fusión entre autofagosomas y lisosomas (Munz, 2011; Beale *et al.*, 2014).

El mecanismo de autofagia está también comprometido en la acumulación de los de ARN y proteínas virales. A través de la inhibición farmacológica de esta vía con 3-Metiladenina o Wortmanina, se demostró una disminución significativa tanto del título viral como de la dosis infecciosa en cultivos de tejidos (TCID₅₀) para IAV (H9N2, H1N1) (Zhou *et al.*, 2009).

Considerando que tanto las infecciones por *S. pneumoniae* como por IAV afectan el sistema autofágico en las células infectadas, es desconocido el rol de este proceso cuando los dos patógenos se encuentran infectando la misma célula. La regulación entre ambos podría ser diferente a la de cada uno por separado; por esta razón, es relevante determinar qué rol cumple este proceso durante la coinfección con ambos patógenos.

Capítulo 5. Coinfección de *S. pneumoniae* e IAV en neumocitos

A lo largo del tiempo se ha visto que las infecciones por virus respiratorios predisponen al organismo a complicaciones bacterianas. Esta asociación tomó una relevancia particular cuando en 1918 la pandemia de gripe se cobró la vida de 40-50 millones de personas en el mundo (Tumpey *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2006). En las tres pandemias del siglo XX (1918, 1957 y 1968), la mayoría de las muertes no se debieron a la infección viral primaria, mas bien estuvieron asociadas a infecciones secundarias por bacterias Gram positivas (Anderson *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2014; Rothberg *et al.*, 2010). Análogamente a influenza, otros virus respiratorios, incluyendo el virus respiratorio sincitial, virus del sarampión, virus parainfluenza, adenovirus, y también rinovirus, pueden predisponer a infecciones secundarias. Diferentes bacterias han sido involucradas con este tipo de mutualismo: *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma pneumoniae*, y *S. pneumoniae*.

Se ha demostrado que *S. pneumoniae* e influenza A pueden interactuar cooperativamente, causando infecciones respiratorias más severas que pueden conducir a la muerte. La infección con IAV facilita la progresión de *S. pneumoniae*, de un organismo comensal a un patógeno potencialmente mortal. Pacientes infectados previamente con IAV son más susceptibles a adquirir infecciones bacterianas secundarias que conduzcan a neumonías graves. En estos individuos, *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* son los patógenos bacterianos más frecuentemente aislados en infecciones secundarias, y son la causa más común de muerte por infecciones en EEUU desde 2002 (Anderson *et al.*, 2005). En 2009, la aparición de un nuevo virus H1N1 cuyo genoma combinó material genético de virus influenza humano, aviar y porcino, causó la primera pandemia en más de 40 años (Dawood *et al.*, 2009). A diferencia de las pandemias de 1957 y 1968, las tasas de mortalidad fueron similares a las epidemias estacionales y la mayoría de las muertes ocurrieron en los adultos jóvenes, en la mayoría de los casos sin enfermedades crónicas subyacentes (Dawood *et al.*, 2012). Aún así, uno de organismos más comúnmente encontrados en las sobreinfecciones bacterianas durante esta pandemia fue *S. pneumoniae* (Muscedere *et al.*, 2013; Centers for Disease *et al.*, 2009).

Patogénesis de la coinfección

La patogénesis de la coinfección entre influenza y *S. pneumoniae* tiene una base multifactorial (McCullers, 2006). En los últimos años se han realizado numerosos estudios que aportan nuevos conocimientos en diversos aspectos de la interacción entre ambos patógenos. Sin embargo, la utilización de diferentes modelos animales, cepa de virus o bacteria utilizada, o tiempo de exposición entre la infección viral y la bacteriana, explicaría los efectos opuestos de algunos modelos (McCullers, 2014; Short *et al.*, 2012).

Efectos de la coinfección sobre el epitelio nasofaríngeo y pulmonar

Se ha propuesto que la susceptibilidad a infecciones neumocócicas secundarias a la infección por IAV es debido al daño ocasionado por el virus en células epiteliales en el tracto respiratorio. La descamación del epitelio respiratorio induce una incrementada adherencia de

neumococo mediante la exposición de diferentes receptores que previamente no estaban disponibles para su adhesión (Siegel *et al.*, 2014; Nita-Lazar *et al.*, 2015). Neumococo expresa una serie de factores de virulencia, como PspA, PspC, CbpA, entre otros, para adherirse a la membrana basal o elementos de la matriz extracelular, tales como fibrina, fibrinógeno y colágeno. En estudios *in vivo* se ha visto que la cepa viral PR8 (H1N1) causa la muerte del epitelio celular, exponiendo sitios para la adherencia en el árbol traqueobronquial (Plotkowski *et al.*, 1986; Avadhanula *et al.*, 2006; King *et al.*, 2009). Asimismo, la infección con IAV disminuye la velocidad mucociliar en epitelio de tráquea de ratón, lo que conduce a una reducción en la remoción de neumococo (Pittet *et al.*, 2010).

De igual manera, la mayoría de las cepas de la gripe estacional no causan lesión pulmonar severa, pero aún pueden facilitar la sobreinfección bacteriana, aunque en menor grado. Tres mecanismos adicionales podrían incrementar la disponibilidad del receptor de unión a la bacteria. En primer lugar, la NA de IAV cliva los residuos de ácido siálico terminal, permitiendo la liberación de las partículas virales de las células infectadas. De esta manera, la actividad enzimática de la NA viral sobre las glicoproteínas de la superficie celular, expone receptores crípticos que contribuirían con la adherencia e invasión de neumococo a los tejidos epiteliales (McCullers *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2001; Nita-Lazar *et al.*, 2015). En segundo lugar, la respuesta inflamatoria del huésped a las infecciones virales puede alterar el estado regulatorio y la expresión de múltiples proteínas de superficie, tales como el PAF-R, uno de los cuales utiliza la bacteria para su invasión celular (Rijneveld *et al.*, 2004; van der Sluijs *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2009). Por último, los cambios en las vías respiratorias durante la cicatrización de heridas pueden proporcionar sitios de adherencia durante la recuperación del tejido (Kostrzynska *et al.*, 1992; McCullers *et al.*, 2003). En áreas en donde la cicatrización no ha concluido se exponen elementos de la membrana basal, como la laminina tipo I y colágeno tipo IV, o donde ha tenido lugar la deposición de fibrina y fibrinógeno, que incrementarían la adherencia de *S. pneumoniae*.

Afectación del sistema inmune

La protección antibacteriana en los pulmones es través de diversos componentes de la inmunidad innata y adaptativa (Kohlmeier *et al.*, 2009; Lipscomb *et al.*, 2010). Los pacientes infectados con IAV son vulnerables a contraer sobreinfecciones bacterianas, sugiriendo que existen defectos en alguno (o en varios) de estos mecanismos de resistencia y eliminación bacteriana. Por un lado, la infección por IAV ocasiona disfunción de los polimorfonucleares (PMN), la cual se considera importante para el éxito de la coinfección, dado que los neutrófilos son células clave en la respuesta a infecciones por neumococo (Abramson *et al.*, 1981; Engelich *et al.*, 2001; McNamee *et al.*, 2006; Standish *et al.*, 2009).

El rol del Interferón tipo-I (IFN-I) en las infecciones virales está bien establecido e incluye la inhibición de la replicación viral, como así también la activación de la respuesta inmune adaptativa (Kolumam *et al.*, 2005; Alsharifi *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que la inducción previa de IFN compromete la respuesta inmune innata (Sun *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012) involucrada tempranamente en la detección y control de patógenos Gram positivos (Koppe *et al.*, 2012; Parker *et al.*, 2011). En este hallazgo, aparentemente contradictorio, IFN-I es producido luego del reconocimiento de los ácidos nucleicos virales a través de receptores celulares tipo-Toll (TLRs), y

actúa suprimiendo las respuestas de neutrófilos y macrófagos que normalmente colaboran en la eliminación de las bacterias en el pulmón. Más aún, se evidenció que el incremento en la expresión de IFN-I es dependiente de la toxina neumolisina (Nakamura *et al.*, 2011). Asimismo, IAV ocasiona una desensibilización de los TLRs (por ejemplo: TLR5, involucrado en la detección de flagelina; TLR4, lipopolisacáridos; TLR2, ácido lipoteicoico) de la superficie de los macrófagos alveolares, ocasionando reducción en la producción de quemoquinas, activación del factor NF- κ B y consecuentemente menor reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección; efecto que dura varios meses, debido a la longevidad de los macrófagos residentes del tracto respiratorio (Didierlaurent *et al.*, 2008). De la misma manera, el estado antiviral promovido por IFN-I, ocasiona disfunción de células NK, que conlleva a una inhibición en la liberación de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas (Mao *et al.*, 2009; Small *et al.*, 2010), deprimiendo la actividad fagocítica normal de macrófagos y neutrófilos. IAV específicamente genera depleción de los macrófagos alveolares (Ghoneim *et al.*, 2013), así como también desencadena la activación de la apoptosis, lo que ocasiona un déficit en la vigilancia y muerte de las bacterias (Kash *et al.*, 2011).

Amplificación del ambiente inflamatorio

La neumonía es una condición inflamatoria de los pulmones. Por lo tanto, los factores virales y bacterianos, o las respuestas del huésped que aumenten la inflamación en respuesta a los patógenos, contribuyen en la patogénesis de la neumonía post coinfección. Algunas cepas de IAV expresan la proteína citotóxica: PB1-F2, que promueve respuestas inflamatorias, generando mayor infiltración celular a los pulmones y las vías respiratorias, y alta producción de citoquinas (McAuley *et al.*, 2007; McAuley *et al.*, 2010). Las bacterias también expresan citotoxinas que contribuyen a la inflamación (Tuomanen *et al.*, 1995), por ejemplo neumolisina, y estos efectos pueden sinergizarse con los de PB1-F2 ocasionando aumento de la muerte celular mediante la formación de poros o potenciando la señalización inflamatoria, dando lugar a una tormenta de citoquinas.

¿Virus-Bacteria o Bacteria-Virus?

Es probable que los factores expresados por neumococo durante la coinfección también afecten al virus. Estudios previos han indicado que existe un efecto direccional; es decir, la sinergia se produce cuando la infección viral precede a la exposición bacteriana y ningún efecto (o incluso existe una respuesta protectora) se produce cuando el orden de desafío se invierte ((Ouyang *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2014). Los modelos animales muestran consistentemente un aumento en los títulos de IAV durante sobreinfecciones bacterianas en las que la exposición a neumococo es posterior a la infección viral; este aumento de la carga viral de pulmón está normalmente acompañado por un retraso en la eliminación bacteriana. Sin embargo, los títulos virales y la morbilidad pueden disminuir a través de la inducción de respuestas inmunes innatas, si la infección bacteriana precede al desafío viral (McCullers *et al.*, 2002; Ouyang *et al.*, 2014).

Durante las epidemias de gripe, las infecciones neumocócicas secundarias a la infección viral presentan una mayor tasa de morbi-mortalidad, respecto a las infecciones por ambos patógenos individualmente (Chertow *et al.*, 2013; Kash *et al.*, 2011). Muchos estudios han descrito mecanismos de virulencia sinérgicos, basados en modelos de ratón donde se evalúa la respuesta sistémica hacia la coinfección (Diavatopoulos *et al.*, 2010; Kosai *et al.*, 2011). Sin embargo, resulta

igualmente relevante comprender las etapas iniciales de la copatogénesis a un nivel subcelular. Descifrar el mecanismo sinérgico por el cual estos dos patógenos interactúan proporcionaría una vía potencial de intervención terapéutica.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

El presente trabajo se centra en el estudio de mecanismos de adaptación a situaciones de estrés que le permitan a *S. pneumoniae* sobrevivir en el huésped. En esta tesis doctoral se pretende estudiar diferentes aspectos de la interacción huésped-patógeno, que aporten conocimientos acerca de los mecanismos moleculares que permiten a neumococo establecer una infección celular. La idea central es investigar el rol de la acidificación en la supervivencia intracelular de la bacteria, la contribución de los TCS bacterianos en el estadio intracelular, así como también aquellos mecanismos moleculares que facilitan el sinergismo con influenza A, incrementando la susceptibilidad a infecciones neumocócicas en hospedadores infectados previamente con el virus.

Objetivos específicos

Nuestros objetivos están orientados a determinar la relevancia de diferentes factores tanto bacterianos como eucariotas en los mecanismos de supervivencia intracelular.

Los estudios están dirigidos a:

1. Establecer un modelo celular para estudiar la infección por *S. pneumoniae*.
2. Evaluar la internalización y supervivencia intracelular de neumococo a lo largo del tiempo en células A549 y RAW264.7.
3. Investigar la contribución de los sistemas de transducción de señales bacterianos en el mecanismo de infección de neumococo.
4. Establecer un modelo celular para estudiar la coinfección entre neumococo e IAV.
5. Estudiar si IAV afecta la internalización o supervivencia de neumococo, y si existe algún sistema de transducción de señales bacteriano que perciba algún cambio producido por el virus.
6. Determinar si el mecanismo de autofagia está implicado en el estadio intracelular de neumococo y en la coinfección con IAV.

RESULTADOS

Capítulo 1: Estudios de la sobrevivencia intracelular de neumococo.

Con el fin de investigar la vida intracelular de *S. pneumoniae*, fue necesario establecer un modelo de infección que permita simplificar su estudio y poder llevar a cabo ensayos microbiológicos, bioquímicos y celulares. Debido a que se ha encontrado *S. pneumoniae* en alvéolos pulmonares y dentro de macrófagos (Mook-Kanamori *et al.*, 2011), se emplearon líneas celulares de cultivo A549 y RAW 264.7, correspondientes a células endoteliales neumocitos tipo II y macrófagos murinos respectivamente.

Para estudiar el comportamiento de neumococo dentro de las células, es importante que el mismo sea el único patógeno de la célula hospedadora. No obstante, las líneas celulares de cultivo se encuentran frecuentemente contaminadas con *Mycoplasma* spp., bacterias intracelulares capaces de alterar severamente el funcionamiento de las células eucariotas, siendo uno de los mayores problemas en lo que respecta a cultivo celular. Estos microorganismos tienen la habilidad de alterar, dependiendo de la especie contaminante, la función, crecimiento, metabolismo, morfología, adhesión, membranas, propagación de virus y producción de interferón en las células hospedadoras (Rawadi *et al.*, 1995; Razin *et al.*, 1998). Por lo tanto, es crucial que las células hospedadoras se encuentren libres de Micoplasma. Por este motivo, se estableció un método específico, sensible y fiable para su detección en células eucariotas, como así también un protocolo para su erradicación de los cultivos celulares contaminados (Uphoff *et al.*, 2002). Además, se diagramó un control periódico de las líneas celulares empleadas para detectar rápidamente cualquier eventual recontaminación y garantizar que los experimentos se lleven a cabo en ausencia de infección por Micoplasma.

1.1 Detección y erradicación de Micoplasma de las células de cultivo.

Los métodos actuales para la detección de Micoplasma se basan en técnicas de cultivo microbiológico, microscopía de fluorescencia, métodos bioquímicos, uso de sondas de ADN, entre otros. Aunque la detección basada en el cultivo de Micoplasma es fiable, tiene la desventaja de requerir nutrientes especiales, ser muy lento (2 a 4 semanas), y su uso se limita a laboratorios especializados, por lo que no suele ser un método de rutina (Drexler *et al.*, 2002). En cambio, el empleo de sondas de ácidos nucleicos para detectar ADN o ARNr de Micoplasma resulta una manera rápida y eficiente, con límites de detección de aproximadamente 10^4 organismos (Gobel *et al.*, 1984; Johansson *et al.*, 1990; Dobrovolsky *et al.*, 2011). En la mayoría de los casos este nivel de sensibilidad es suficiente, aunque puede ser demasiado bajo para líneas celulares recién contaminadas, tratadas con antibióticos o crecidas en presencia de bajas concentraciones de suero. Además, las sondas de ADN no siempre son específicas para Micoplasma debido a falsos positivos con bacterias gram positivas (Gobel *et al.*, 1984; Johansson *et al.*, 1990). Uno de los métodos más empleados para la detección de Micoplasma se basa en la tinción de ADN con un fluorocromo como por ejemplo Hoescht 33258 o DAPI, y posterior inspección por microscopía de epifluorescencia. El patrón positivo de infección por Micoplasma muestra una tinción difusa sobre el citoplasma celular que corresponde a la unión del fluoróforo con el material genético de los microorganismos. Sin

embargo, los resultados obtenidos por esta técnica presentan una elevada variabilidad y las conclusiones dependen en gran medida de la interpretación del operador. Por último, se encuentra el método de PCR, el cual se basa en determinar la presencia de secuencias conservadas evolutivamente entre las distintas especies de *Mycoplasma* que codifican para el ARNr de la subunidad 16S ribosomal (Rawadi *et al.*, 1995; Timenetsky *et al.*, 2006; Uphoff *et al.*, 2014). Este método se diferencia de los anteriores debido a que es rápido, altamente específico y sensible.

Con el fin de determinar si las líneas celulares A549 y RAW 264.7 que se disponían en el laboratorio se encontraban contaminadas con *Mycoplasma*, se emplearon de forma complementaria los métodos de detección mediante la reacción de PCR y la tinción de ADN con Hoescht-33258. La reacción de PCR se llevó a cabo con ADN extraído de células A549 y RAW (mediante precipitación con cloroformo) y los primers universales MGSO-GPO3 que reconocen secuencias conservadas de diferentes especies de *Mycoplasma* (**Anexo Tabla 4**). Se observó una banda de 270 pb en ambas líneas celulares (**Fig. 1A** [Sin tratamiento (Tx)]), lo cual indica que las mismas se encontraban contaminadas con *Mycoplasma*. Por microscopía de las células A549 (**Fig. 1B**) y RAW264.7 (datos no mostrados) teñidas con Hoescht, se observó la presencia de ADN en el citoplasma, corroborando la contaminación bacteriana.

Para eliminar el *Mycoplasma* presente en las células se las sometió a un tratamiento con antibióticos específicos. Existen diferentes antibióticos a los cuales *Mycoplasma* es sensible, entre ellos el más difundido es ciprofloxacina, aunque diversos estudios describen una tasa elevada de resistencia al mismo (15 %) como así también un porcentaje bajo de cura (78 %) (Drexler, 2002; Taylor-Robinson, 1997). En cambio, el antibiótico Sparfloxacina, una quinolona de nueva generación, presenta en comparación al anterior un porcentaje menor de resistencia (11 %) y muerte de las células en tratamiento (4 %), así como también una probabilidad mayor de cura (85%) (Uphoff *et al.*, 2002). Por consiguiente, las líneas celulares de trabajo se trataron con Sparfloxacina durante 7 días e inmediatamente terminado el tratamiento se verificó su efectividad mediante la detección de *Mycoplasma* por PCR y por tinción de las células eucariotas con Hoescht.

Tanto la microscopia de fluorescencia de las células (**Fig. 1C**) como la electroforesis en gel de agarosa de las muestras de PCR (**Fig. 1A** [Post-Tx R0]) muestran la ausencia de *Mycoplasma* en las líneas celulares tratadas con el antibiótico. El ser humano es una de las principales fuentes de contaminación con *Mycoplasma* en los cultivos celulares, por lo que el manejo de las células tratadas con una serie de cuidados especiales, permite mantener la asepsia en los cultivos. Los recaudos tomados comprende meticulosidad en la técnica operaria dentro y fuera de la campana de flujo laminar (McGarrity, 1976), en los materiales, reactivos y medios de cultivos utilizados, incluyendo el suero y la tripsina. Para evaluar si las células se re-infectaron durante su manipulación, se llevó a cabo la determinación de *Mycoplasma* mediante PCR del ADN extraído a células luego de 6 pasajes posteriores al tratamiento con Sparfloxacina. Los resultados obtenidos no mostraron una recontaminación con *Mycoplasma* (**Fig. 1A** [Post-Tx R6]). Asimismo, para verificar que las células permanecieran libres de contaminación, se realizaron controles periódicos mediante las metodologías mencionadas anteriormente.

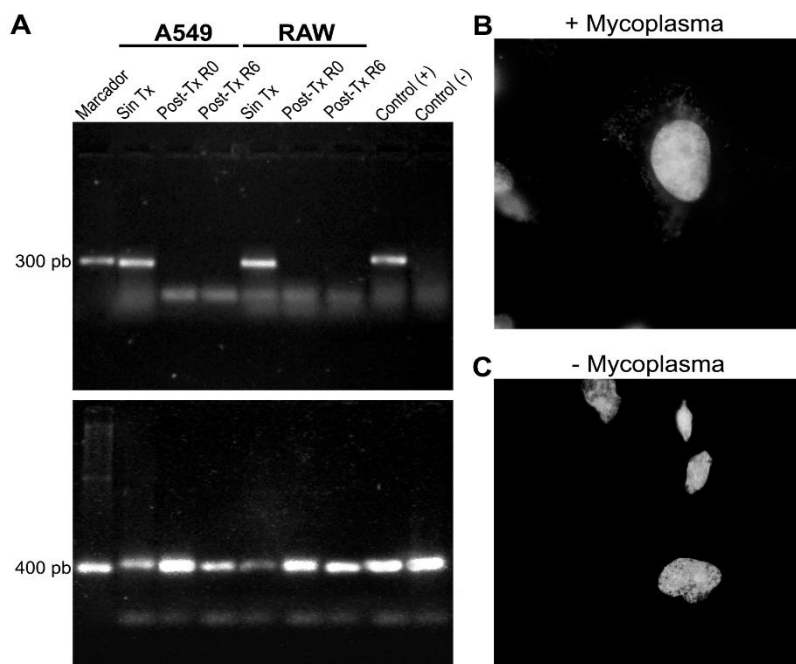


Fig. 1 Evaluación de la contaminación por Micoplasma en células A549 y RAW 264.7.

A) Reacción de PCR utilizando primers universales (MGSO-GPO3). La presencia de DNA de Micoplasma se observó como una banda de 270 bp. Se testaron células previo tratamiento con antibióticos (Sin Tx), inmediatamente luego del tratamiento (post-Tx R0) y después de 6 repiques (post-Tx R6). Como control de calidad y cantidad de muestra, se realizó PCR utilizando primers dirigidos a secuencias conservadas en las células eucariotas (GAPDH) (401pb). B) y C) Células A549 positivas (B) o negativas (C), post-tratamiento con Sparfloxacin para Micoplasma analizadas mediante tinción con Hoescht y microscopía confocal.

1.2 Modelo celular de infección con neumococo.

Una cuestión importante en el establecimiento de un modelo experimental de infección por neumococo es la elección de la cepa bacteriana a utilizar. La adaptación de la bacteria a diferentes condiciones del entorno es necesaria para una infección exitosa, por lo que *S. pneumoniae* modula la expresión de determinantes de virulencia que son importantes para su adaptación a un microambiente en particular. Si bien la presencia de la cápsula bacteriana es beneficiosa en los primeros pasos de la infección y en la virulencia sistémica, el grado de exposición de ciertas moléculas (adhesinas) en la superficie bacteriana se ve influido por el espesor de la misma. Por esta razón, la bacteria modera dicha estructura para asegurar una internalización exitosa en la célula hospedadora (Hammerschmidt *et al.*, 2005). Los genes que codifican los componentes de la cápsula bacteriana se encuentran fuertemente regulados (Bender *et al.*, 2001; Yother, 2011; James *et al.*, 2012; Ogunniyi *et al.*, 2002; LeMessurier *et al.*, 2006; Morona *et al.*, 2000), y se ha visto que cepas acapsulares de neumococo presentan mayor adherencia *in vitro* a células humanas respiratorias en comparación con su derivada isogénica capsular (Talbot *et al.*, 1996). Además, estudios de infección celular *in vitro* con neumococo, muestran que una cepa capsulada de la bacteria es menos invasiva que una acapsulada (Ring *et al.*, 1998; Kjos *et al.*, 2015). Por lo tanto, en el modelo experimental de infección se empleó la cepa acapsulada R801, que se halla optimizada genéticamente en sus sistema de reparación de DNA, lo cual radica en una ventaja para la construcción de mutantes por inserción en el cromosoma.

Con el fin de elucidar los mecanismos de sobrevivencia de la bacteria dentro de la célula hospedadora, se realizaron diferentes experimentos mediante ensayos de protección a antibióticos. Después de infectar los cultivos eucariotas con un determinado inóculo bacteriano, se adicionaron los antibióticos gentamicina y penicilina G para matar las bacterias extracelulares y posibilitar la sobrevivencia de aquellas que solamente permanecieron protegidas intracelularmente. Este método requirió establecer previamente el tamaño del inóculo y el tiempo de infección, para

luego llevar a cabo correctamente las determinaciones cinéticas de la infección bacteriana. Los tiempos de infección son dependientes de la línea celular empleada. Se utilizó una cinética de infección que permita detectar bacterias internalizadas mediante recuento en placas. Mientras que se requirió al menos 2 h de infección en las células A549, las células fagocíticas profesionales RAW264.7 solo necesitaron 0,5 h (datos no mostrados). Por lo tanto, para llevar a cabo los estudios de sobrevivencia y garantizar un recuento en placas, se estableció un tiempo de infección de 3 h para A549 y 1 h para RAW264.7.

1.3 Optimización de la relación bacterias/célula hospedadora en el modelo de infección.

Algunas infecciones suelen ocasionar la muerte de la célula hospedadora, fenómeno que en ciertas ocasiones se correlaciona con la relación entre el número de bacterias y el de célula eucariota, es decir la multiplicidad de infección (MOI). En particular, neumococo induce mecanismos que llevan a la muerte de las células, ya sea por apoptosis y/o necrosis (Marriott *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013; Bewley *et al.*, 2011). Naturalmente, estos efectos están vinculados con factores de virulencia del patógeno y con mecanismos de defensa de la célula huésped. Sin embargo, un excesivo tiempo de infección o cantidad de inóculo podrían producir artificialmente el mismo efecto, por ejemplo por una rápida acidificación del medio de cultivo. Por lo tanto, la cantidad de bacteria utilizada y el tiempo de infección en los ensayos de sobrevivencia se optimizaron para obtener una respuesta biológica sin comprometer la viabilidad de la célula infectada. Para establecer la MOI de trabajo, se realizaron infecciones de células A549 con diferentes MOI de la cepa R801 de neumococo, y mediante marcación con Anexina V y 7-AAD se determinó el porcentaje de apoptosis y necrosis a distintos tiempos de infección. 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, la sonda fluorescente 7-AAD (7-amino-actinomicina D) tiene una alta afinidad por el ADN y se emplea como un marcador de necrosis porque es eficientemente excluida de las células intactas.

Las células A549 se infectaron con neumococo durante 180 min y luego se trataron con gentamicina y penicilina durante 60 y 180 min (**Fig. 2A**). Las determinaciones de apoptosis y necrosis se llevaron a cabo a los tiempos 200, 240 y 360 min de inicio del experimento (**Fig. 2B**). Mediante citometría de flujo de las células marcadas con Anexina V y 7AAD no se observaron diferencias en la cantidad de células hospedadoras muertas, luego de 180 min de infección con diferentes MOI bacterianas (**Fig. 2B, C**). No obstante, a los 360 min la cantidad de células viables se redujo a 18% cuando las células se infectaron con MOI 100 (**Fig. 2B, C**). Las MOI 1 y 20 no generaron grandes cambios en la necrosis y apoptosis de las células A549 a los tiempos ensayados. Para llevar a cabo los estudios de infección con neumococo resulta imperativo preservar la integridad celular eucariotas ya que funciona 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%. Debido a que una MOI de 20 genera una infección efectiva y no ocasiona grandes efectos citopáticos en las células A549 (**Fig. 2B, C**), se utilizó esta relación bacteria:célula para los experimentos posteriores.

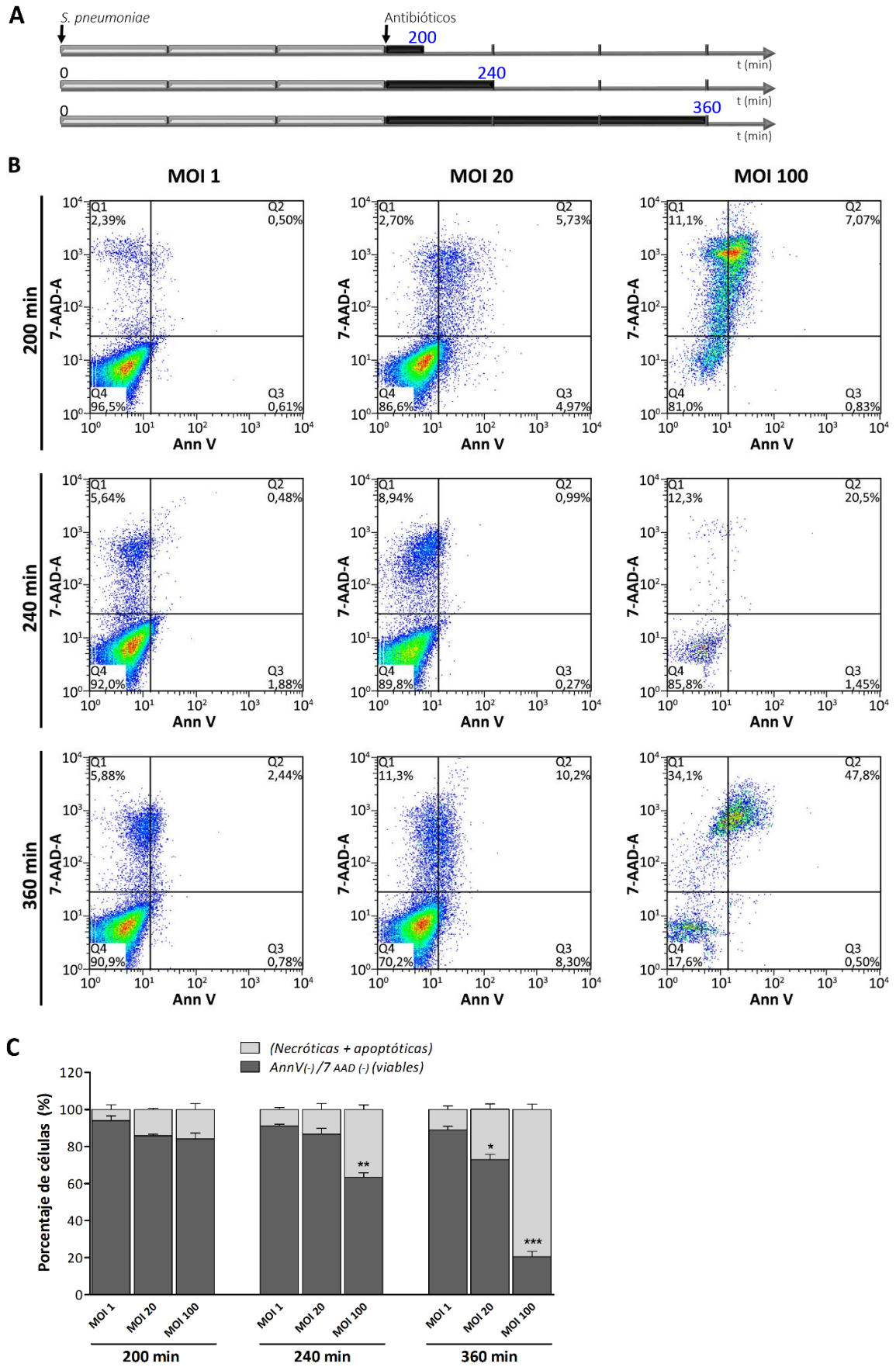
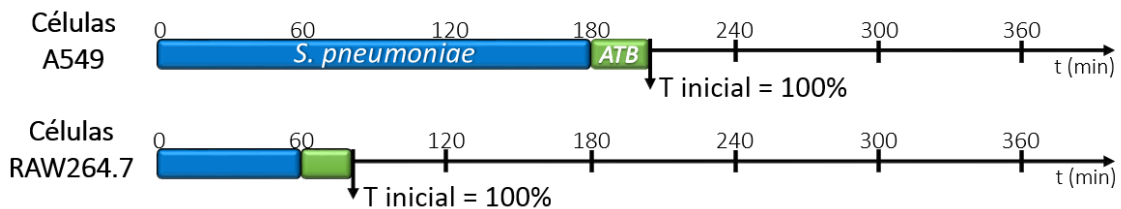


Fig 2. El incremento en las MOI produce una disminución de la viabilidad celular.

A) Diagrama experimental empleado en el ensayo. B) Las células A549 se infectaron con neumococo durante 180 min utilizando MOI 1, 20 y 100 y luego se trataron con antibióticos (penicilina 200 ug/mL y gentamicina 900ug/mL) durante 60 y 180 min. El análisis se llevó a cabo por citometría de flujo a 200, 240 y 360 min del inicio de la infección y se utilizó Annexina V como marcador de apoptosis y 7AAD como marcador de necrosis. Los gráficos de puntos representan la fluorescencia de células positivas para 7AAD (cuadrante superior izquierdo), para Annexina V (cuadrante inferior derecho) y para Annexina V y 7AAD (cuadrante superior derecho [células doblemente positivas]). Los porcentajes de células positivas se muestran en los cuadrantes correspondientes. C) Análisis cuantitativo de la marcación de Annexina V (AnnV) y 7AAD a diferentes tiempos (180, 240, 360 min) post infección con neumococo en células A549. El 100% de los valores corresponde a 50.000 células analizadas mediante citometría de flujo, excepto en el caso MOI 100 (360 min) donde el 100% corresponde a 10000 células analizadas. Los valores representan la media \pm SD de dos experimentos independientes. El test estadístico utilizado fue Anova de dos vías, seguido del Test Post Hoc Bonferroni. Las diferencias significativas son indicadas como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ n=2.

Esta puesta a punto también se llevó a cabo en las células RAW264.7, donde se observó que la MOI óptima también fue 20, resultando en un 70% de células viables después de 360 min de infección (datos no mostrados). De esta manera, se estableció el siguiente esquema experimental de trabajo:



Esquema 10. Modelo experimental de infección con *S. pneumoniae* según líneas celulares A549 y RAW264.7.

1.4 Sobrevida intracelular de *S. pneumoniae*.

Para establecer una infección, es necesario que neumococo sea capaz de invadir eficientemente las células del hospedador. Diferentes trabajos han obtenido una aproximación a este mecanismo, evaluando la ubicación subcelular de la bacteria (Radin *et al.*, 2005; Asmat *et al.*, 2014), su alojamiento dentro de compartimientos del tipo vesicular (Talbot *et al.*, 1996) o la sobrevida intracelular en cultivos tratados con diferentes antibióticos (Mandell *et al.*, 2000). Sin embargo, no se conoce el curso temporal de la infección una vez que la bacteria ingresó a la célula hospedadora, el mecanismo de sobrevida o su evasión a la respuesta celular.

Para indagar al respecto, se infectaron monocapas de células A549 y RAW264.7 con la cepa de neumococo R801 y luego de un período de infección (dependiente de la línea celular), se incubaron con antibióticos extracelulares. Seguidamente, las células eucariotas se lisaron a fin de comparar el número de bacterias internalizadas en ambas líneas celulares. Se pudo observar que el ingreso de neumococo en células A549 es aproximadamente 50 veces menor que en las células RAW264.7 (**Fig. 3A**). Esto sería consistente con la naturaleza fagocítica de los macrófagos, cuya función es la remoción de cuerpos extraños como primera línea de defensa natural.

A continuación, resultó interesante conocer el destino de aquellas bacterias que han logrado ingresar a la célula hospedadora. Es por ello que se evaluó la cinética de la infección a través del recuento de bacterias intracelulares obtenidas luego de la infección, incubación con antibióticos y posterior lisis celular a diferentes tiempos de ensayo. Se observó que *S. pneumoniae* sobrevive al menos 6 hs dentro de neumocitos A549 (**Fig. 3B**) y 5 hs dentro de macrófagos RAW264.7 (**Fig. 3C**).

Estos resultados indican que una población de neumococo es capaz de permanecer viable durante varias horas dentro de células eucariotas.

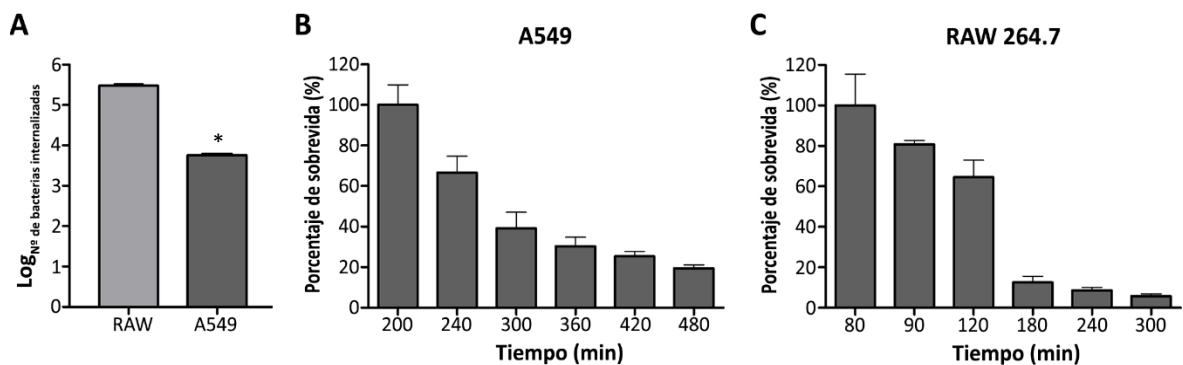


Fig. 3 Internalización y sobrevida intracelular de neumococo.

A) Cultivos de neumocitos A549 y macrófagos RAW264.7 fueron infectados con neumococo. Seguidamente, las células se lisaron previo tratamiento de 20 min con antibióticos extracelulares. La cuantificación de las bacterias internalizadas se llevó a cabo mediante recuento en placas. B) Células A549 fueron infectadas con neumococo por 180 min, e incubadas con antibióticos extracelulares hasta alcanzar los 200, 240, 300, 360, 420, 480 min. El porcentaje de sobrevida intracelular a cada tiempo fue referido a la cantidad de bacteria que ingresó inmediatamente luego del tratamiento con antibióticos (100% = 200 min). C) Células RAW264.7 fueron infectadas con neumococo por 60 min, e incubadas con antibióticos extracelulares hasta alcanzar los 80, 90, 120, 180, 240, 300 min. El porcentaje de sobrevida intracelular a cada tiempo fue referido a la cantidad de bacteria que ingresó inmediatamente luego del tratamiento con antibióticos (100% = 80 min). El test estadístico utilizado para el gráfico A) fue t-Student de dos colas. Las diferencias significativas son indicadas como * $n < 0.05$.

1.5 Efecto de la inhibición lisosomal en la sobrevida de neumococo.

Mediante el mecanismo de endocitosis, el material extracelular se transporta desde la superficie de la célula hacia los lisosomas donde el cargo es generalmente degradado (van der Goot *et al.*, 2006). Se ha visto que neumococo, luego de 30 min de haber ingresado a células endoteliales de cerebro de rata, se aloja dentro de vacuolas cubiertas con las proteínas Rab7 y LAMP1, lo que es consistente con una marca hacia la vía degradativa lisosomal (Radin *et al.*, 2005). Para elucidar si la acidificación lisosomal desempeña un rol importante en la muerte bacteriana, se observó el comportamiento intracelular de neumococo al bloquear la acidificación.

Se realizaron ensayos de invasión en presencia de inhibidores específicos de la H⁺-ATPasa del lisosoma (bafilomicina A1) o de neutralizantes de la acidificación vacuolar (Cloroquina). Para descartar que los inhibidores tuvieran algún efecto en el crecimiento de la bacteria, se realizaron curvas de crecimiento de la bacteria en presencia de los inhibidores a las concentraciones utilizadas en el ensayo de sobrevida intracelular. El análisis comparativo con el cultivo sin inhibidores no reveló diferencia alguna en el crecimiento bacteriano (datos no mostrados).

Con el objeto de examinar el número de bacterias intracelulares vivas a lo largo del tiempo, se infectaron células A549 y RAW264.7 con neumococo R801. Luego del período de infección, las monocapas se incubaron en medio fresco conteniendo antibióticos extracelulares junto con bafilomicina A1 (BafA1 100 nM), cloroquina (Chq 12,5 μM) o DMEM (control), según corresponda. Los cultivos celulares se lisaron permitiendo cuantificar las bacterias intracelulares mediante recuentos por diluciones en placas. Luego del tratamiento con los inhibidores farmacológicos mencionados, se observó una disminución significativa en la cantidad de UFCs que provienen del interior celular respecto a las células no tratadas (**Fig. 4A, B**). Esta reducción en la cantidad de bacterias intracelulares, observada luego de la inhibición de la acidificación, podría deberse a un

efecto citotóxico de los inhibidores sobre las células hospedadoras, o bien a la acidificación como requisito indispensable para el éxito en la sobrevida intracelular bacteriana. Para distinguir entre estas posibilidades, se realizó un ensayo de citometría de flujo utilizando las células tratadas con inhibidores, con el fin de evaluar los porcentajes de apoptosis y necrosis mediante la marcación con Anexina V y 7_{AAD}, respectivamente. Se infectaron células A549 con neumococo R801 por 180 min. Posteriormente se incubaron con DMEM, BafA1 o Clh_q, durante 20 y 180 min, según corresponda. Las determinaciones de apoptosis y necrosis se llevaron a cabo a los tiempos 200 y 360 min de inicio del experimento. El tratamiento con los bloqueantes de la acidificación no afectó la viabilidad de los cultivos, registrando incluso una tendencia a aumentar la cantidad de células no apoptóticas/no necróticas (Fig. 5). El mismo ensayo fue realizado en células RAW264.7 y se constató los inhibidores no ocasionan efectos tóxicos en las células (datos no mostrados). Estos resultados señalan a la acidificación como un evento importante para asegurar la permanencia de la bacteria dentro de la célula.

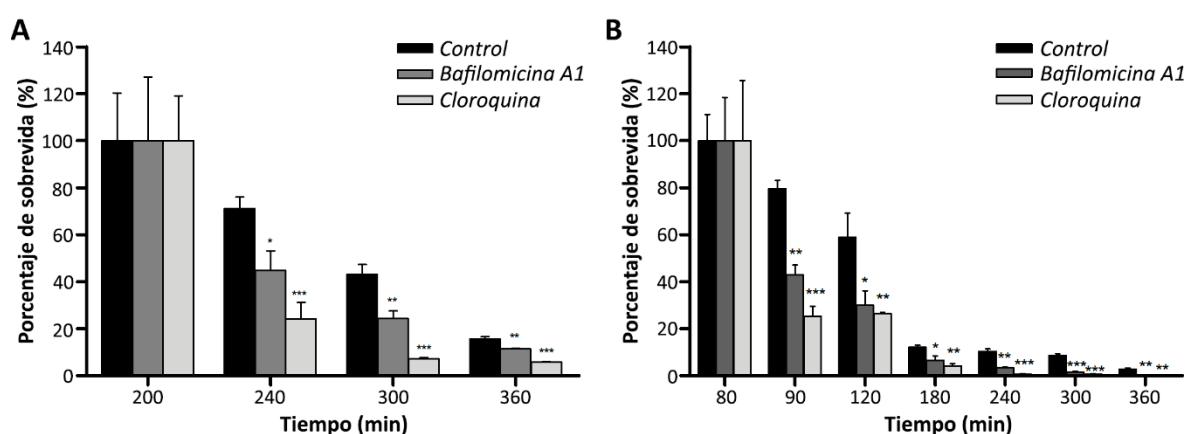


Fig. 4. Efecto de los inhibidores de la acidificación en la sobrevida intracelular de neumococo. Células A) A549 B) RAW264.7 infectadas con neumococo por 180 y 60 min, respectivamente. Luego de la incubación concomitante de antibióticos extracelulares e inhibidores de la acidificación durante diferentes tiempos, las células se lisaron para permitir en recuento intracelular por diluciones seriadas en placas. El porcentaje de sobrevida intracelular a cada tiempo fue referido a la cantidad de bacteria que ingresó inmediatamente luego del tratamiento con antibióticos (100% = 200 y 80 min según corresponda a cada línea celular). El test estadístico utilizado fue Anova de dos vías, seguido del Test Post Hoc Bonferroni. Las diferencias significativas son indicadas como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, $n=3$.

1.6 Autofagia, ¿un mecanismo implicado en la infección por neumococo?

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de autofagia es un proceso celular conservado a lo largo del tiempo, y resulta fisiológicamente importante para la degradación lisosomal de proteínas, organelas dañadas y microbios intracelulares. Sin embargo, muchos patógenos bacterianos intracelulares han desarrollado mecanismos para evitar el reconocimiento de esta vía degradativa, como también para manipularla en beneficio propio (Fedrigo *et al.*, 2011; Cemina *et al.*, 2012; Pareja *et al.*, 2013).

Con el fin de evaluar si la vía autofagica tiene alguna participación durante el estadio intracelular de *S. pneumoniae*, se evaluó la formación de autofagosomas mediante la conversión de LC3-I en LC3-II. Para abordar este punto, se llevaron a cabo ensayos de Western Blot utilizando un anticuerpo que se une a un marcador clásico de autofagia, LC3 (microtubule-associated protein 1 light-chain 3). LC3 es una proteína que se presenta en dos formas, una con distribución citosólica y nuclear (LC3-I) y otra formada por la conjugación del lípido fosfatidiletanolamina (LC3-II), la cual es reclutada a la membrana de los autofagosomas (Kabeya *et al.*, 2000). En ensayos de immunoblots,

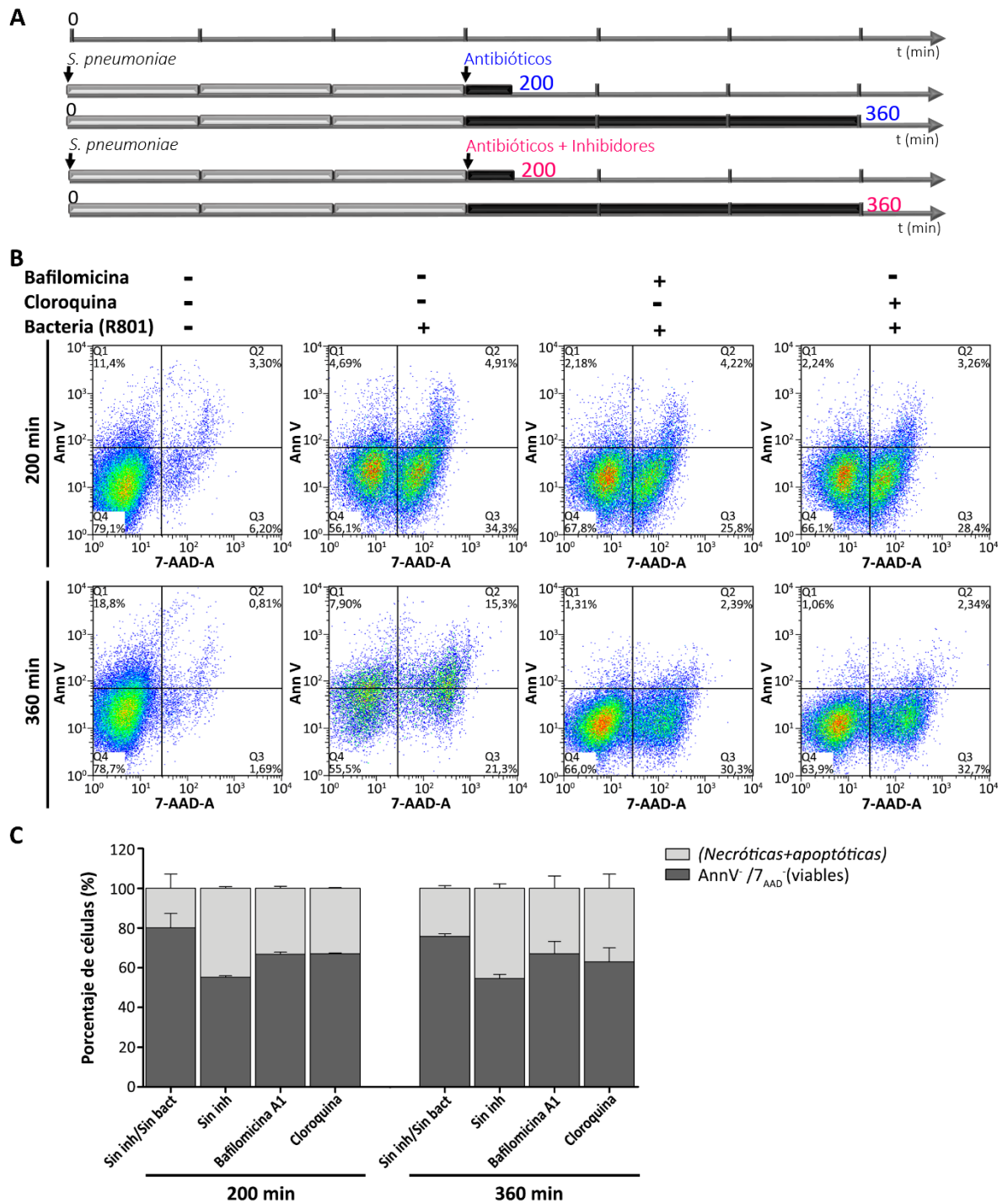


Fig. 5. El tratamiento de las células con inhibidores de la acidificación no afecta la viabilidad de cultivos infectados con neumococo.

A) Diagrama experimental empleado en el ensayo **B)** Células A549 fueron infectadas con neumococo (cepa R801) durante 180 min. Posteriormente se incubaron de manera simultánea (penicilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y gentamicina 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$) junto con bafilomicina (100nM) o Cloroquina (12,5 μM), según corresponda, por 20 y 180 min. El análisis se llevó a cabo por citometría de flujo a 200 y 360 min del inicio de la infección y se utilizó Annexina V como marcador de apoptosis y 7AAD como marcador de necrosis. Los gráficos de puntos representan la fluorescencia de células positivas para 7AAD (cuadrante inferior derecho), para Annexina V (cuadrante superior izquierdo) y para Annexina V y 7AAD (cuadrante superior derecho [células doblemente positivas]). Los porcentajes de células positivas se muestran en los cuadrantes correspondientes. **B)** Análisis cuantitativo de la marcación de células 7AAD y AnnV negativas (viables) y de la suma de las $\text{AnnV}^{\text{negativas}}/\text{7AAD}^{\text{positivas}} + \text{AnnV}^{\text{positivas}}/\text{7AAD}^{\text{negativas}} + \text{AnnV}^{\text{positivas}}/\text{7AAD}^{\text{positivas}}$ (necróticas + apoptóticas) a diferentes tiempos (200 y 360 min) post infección con neumococo en células A549. El 100% de los valores corresponde a 50.000 células analizadas mediante citometría de flujo. Los valores representan la media \pm SD de dos experimentos independientes. El test estadístico utilizado fue Anova de dos vías, seguido del Test Post Hoc Bonferroni, $n=2$.

LC3 se presenta como dos bandas proteicas: la isoforma LC3-I correspondiente a 18kDa y LC3-II de 16kDa. Los niveles de expresión de LC3-II son los que se correlacionan con el número de autofagosomas, y bajo ciertas condiciones, sugieren la activación de esta vía (Mizushima *et al.*, 2007; Klionsky *et al.*, 2012).

En condiciones fisiológicas, la actividad autofágica es usualmente baja, aunque puede ser inducida utilizando Rapamicina, un inhibidor de la quinasa mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*), entre otros (Sarkar *et al.*, 2009). A su vez, la utilización de inhibidores lisosomales, bloquean la fusión entre los autofagosomas y lisosomas, lo que supone una acumulación de LC3-II, al impedir su degradación lisosomal. Células A549 se trataron durante 120 min con Rapamicina o en combinación con los inhibidores lisosomales: bafilomicina A1 (Baf A1) y Cloroquina (Clq), respectivamente. Luego, se lisaron las células y se separaron las proteínas por SDS-PAGE en gel al 15 %. Mediante análisis de Western Blot empleando anticuerpos anti-LC3 y anti- β -Actina (como control de carga) se determinaron los niveles de LC3-II. El tratamiento farmacológico con Rapamicina indujo un incremento en los niveles de LC3-II (**Fig 6** [carril 1]), que se acentuó al utilizar la combinación de Rapamicina con BafA1 o Clq (**Fig 6** [carriles 2 y 3]).

Simultáneamente, se examinó la conversión de LC3-I a LC3-II en células A549 infectadas con neumococo (R801), luego de 60 y 180 min de infección. Los lisados celulares se analizaron por SDS-PAGE y Western Blot, utilizando anticuerpos anti-LC3 y anti- β -Actina. Se observó un incremento en la isoforma LC3-II en las células infectadas con neumococo R801 en comparación con la situación sin infección (ST), indicando que el mecanismo de autofagia está involucrado en la infección por neumococo (**Fig 6** [carriles 6, 7 y 8]).

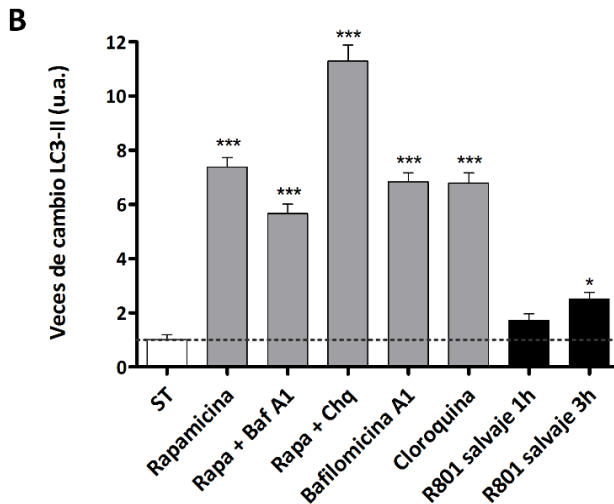
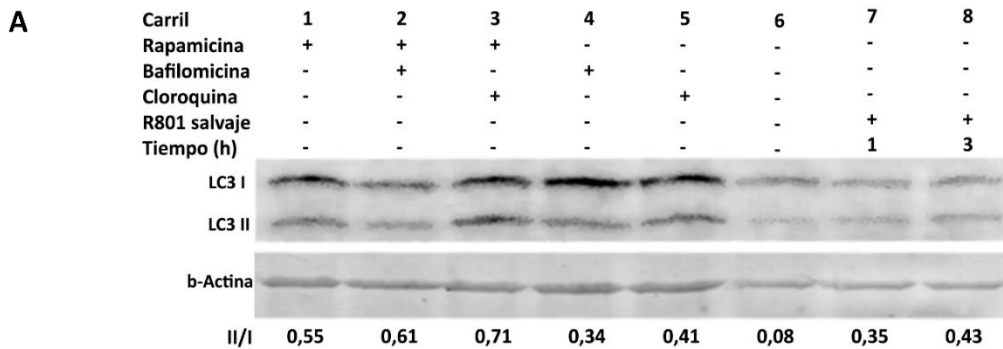


Fig. 6. La infección con *S. pneumoniae* favorece la acumulación de autofagosomas en células A549.

A) Células A549 se incubaron en presencia o ausencia de neumococo (R801) por 60 y 180 min. Se realizaron controles de inducción de autofagia utilizando Rapamicina (80ug/ml), Rapamicina e inhibidores de la fusión lisosoma-autofagosoma, bafilomicina (100 nM) y Cloroquina (12,5 μ M). Los lisados celulares fueron analizados por WB usando anticuerpos anti-LC3. B) Las células se lisaron con RIPA y las muestras fueron analizadas por WB utilizando anticuerpos anti-LC3 y anti- β -Actina. B) Análisis cuantitativo de los niveles de LC3-II. La intensidad de las bandas se cuantificó usando el programa Odyssey-LI-COR. En cada condición se normalizó LC3-II con β -actina y se representó como veces de cambio respecto a la intensidad de banda en la condición Sin Tratamiento (ST). El test estadístico utilizado fue ANOVA de una vía, seguido del Test Post Hoc Dunnett (Grupo control: ST). Las diferencias significativas son indicadas como * $p < 0.05$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Capítulo 2: Sistemas de dos componentes.

2.1 Implicancia de los sistemas de dos componentes en la internalización y sobrevivida intracelular de neumococo.

Durante la colonización e invasión al hospedador, neumococo desafía diferentes ambientes intracelulares, para los cuales debe regular la expresión de genes que le permiten afrontar dichas condiciones (Hava *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2001; Polissi *et al.*, 1998). En bacterias, los cambios de las condiciones ambientales son generalmente percibidos por sistemas de dos componentes (TCS), conformados por una proteína histidín-quinasa anclada a la membrana y un regulador de respuesta citosólico, el cual cuenta con un dominio de unión al ADN. Como se describió previamente, neumococo sobrevive varias horas dentro de las células hospedadoras, es decir, prevalece transitoriamente evadiendo de alguna manera los mecanismos de defensa intracelulares (acidificación gradual de los endosomas, activación de proteasas lisosomales, estallido respiratorio en el caso de macrófagos, entre otros). Para investigar cuáles son los TCS críticos para la sobrevivida intracelular de *S. pneumoniae*, se realizó la mutagénesis sistemática de 11 TCS con la intención de inhabilitar su funcionalidad. Se empleó el mecanismo de inserción-duplicación (Morrison *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1998) para el gen correspondiente a cada histidín-quinasa o en su defecto al regulador de respuesta (*rr14*) (Anexo Tabla 2).

Teniendo en cuenta que las mutantes generadas tienen bloqueada la señalización de cada uno de los sistemas que sensan diferentes estímulos, fue de interés verificar su capacidad de internalización en monocapas de células A549, respecto a la cepa salvaje. Para tal fin, se infectaron células A549 con cada una de las cepas mutantes de TCS, y luego de 3 hs de infección se incubó con antibióticos extracelulares por 20 min. Se procedió al **recuento inmediato** de las unidades formadoras de colonias (UFC) provenientes del interior celular, las cuales permanecieron al resguardo de los antibióticos. Se puso en evidencia que la carencia de las histidín-quinasas MicB, HK03, HK04, HK06, HK11, ComE y el regulador de respuesta RitR, afectan de algún modo la cantidad de bacteria que ingresa a la célula hospedadora (Fig. 7). En este contexto, se observa que MicB y RitR impactan fuertemente en los mecanismos invasivos. Por otra parte, las mutantes en las HK01, HK08, HK09 y HK10 presentan un fenotipo similar a la cepa salvaje.

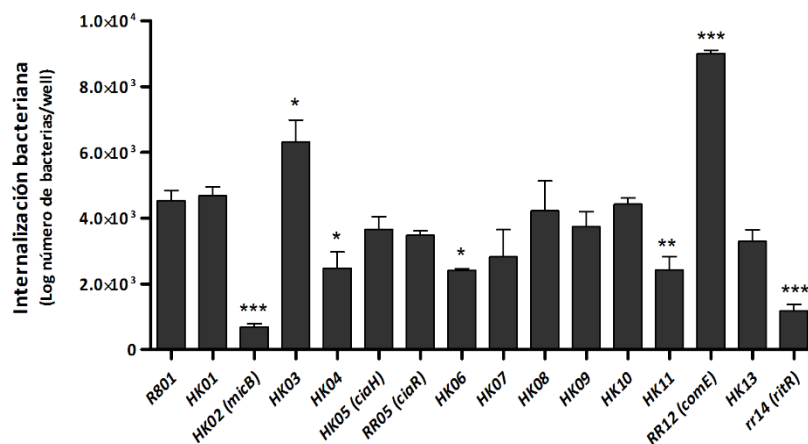


Fig. 7 Diferencias en la internalización de las mutantes de los sistemas de transducción de señales en neumococo. Cultivos de neumocitos A549 fueron infectados por 180 min con las diferentes cepas mutantes de neumococo. Seguidamente, las células se lisaron para recuperar las bacterias que había sido internalizadas antes de la adición de antibióticos extracelulares por 20 min. La cuantificación se llevó a cabo mediante recuento en placas por diluciones seriadas. El test estadístico fue ANOVA de una vía, seguido del Test Post Hoc Dunnett (Grupo control: R801). Las diferencias significativas son indicadas como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

A continuación, el estudio se enfocó exclusivamente en el destino de la bacteria que ha logrado ingresar a la célula hospedadora. Para ello, se verificó en cada mutante la capacidad de sobrevivir intracelularmente a lo largo del tiempo respecto a la cepa salvaje, dado que la carencia de funcionalidad de algún sistema de dos componentes podría aportar información respecto a rol en la sobrevivencia intracelular del patógeno. Se infectaron células A549 con las diferentes mutantes, y luego de la incubación con antibióticos extracelulares, se lisaron las células eucariotas a **diferentes tiempos**. Las bacterias que se mantuvieron protegidas dentro de los neumocitos fueron capaces de crecer en placas de BHI, permitiendo de esta manera su recuento. Las mutaciones en los reguladores de respuesta *ciaR* y *rr14* disminuyeron notablemente la cantidad de bacterias recuperadas del interior de los neumocitos (**Fig. 8 A, C**), atribuyéndoles a esos sistemas de señalización bacteriana una función protectora. Por el contrario, las mutantes *comE* y *hk09* exhibieron un incremento en la sobrevivencia intracelular, en todos los tiempos ensayados comparadas con la cepa salvaje (**Fig. 8 B, D**), esto sugiere que ambos sistemas cumplen una función negativa en los mecanismos de auxilio de la bacteria frente al desafío intracelular.

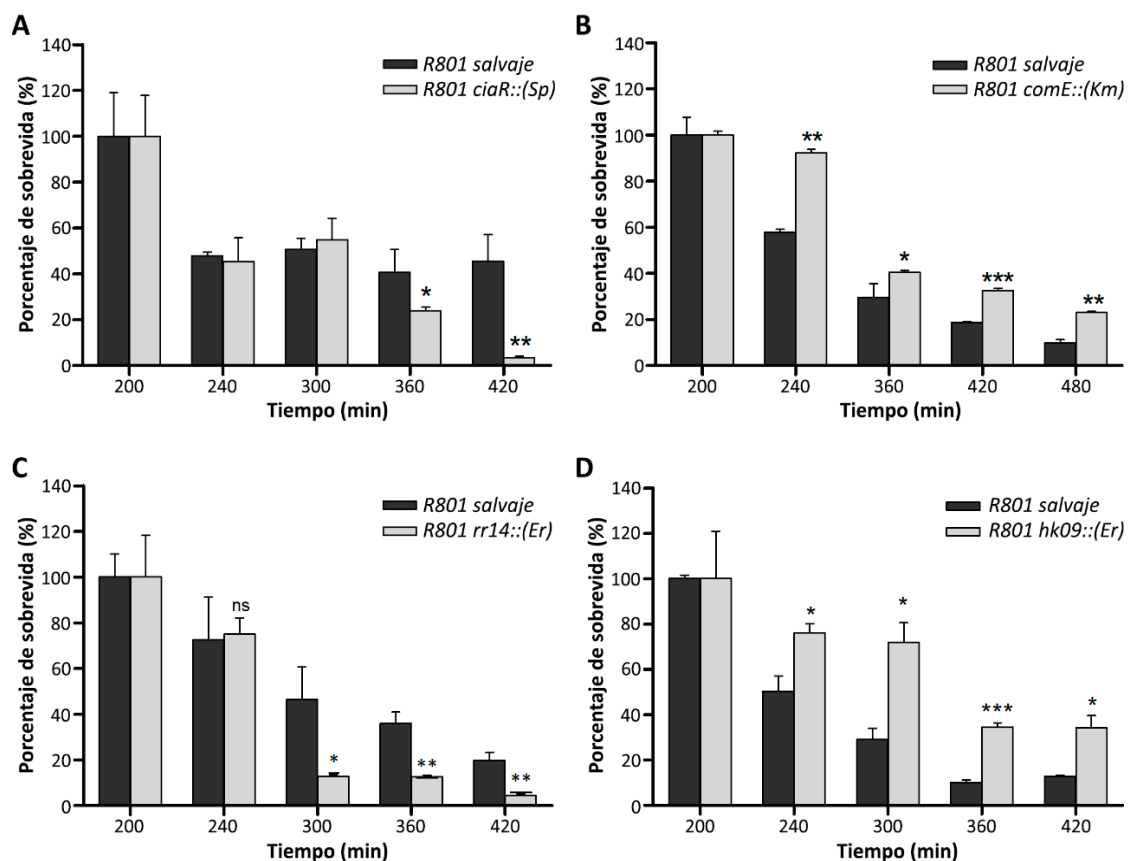


Fig. 8. La sobrevivencia de *S. pneumoniae* dentro de células A549 es regulada parcialmente por *ciaR*, *comE*, *rr14* y *hk09*.

Células A549 fueron infectadas con las mutantes *ciaR* **A**), *comE* **B**), *rr14* **C**) y *hk09* **D**) durante 180 min. Posteriormente, los cultivos se incubaron con antibióticos extracelulares por 200, 240, 300, 360 y 480 min. Al tiempo correspondiente las células se lisaron para permitir el recuento intracelular por diluciones seriadas en placas. El porcentaje de sobrevivencia intracelular en cada punto fue referido a la cantidad de bacteria que ingresó inmediatamente luego del tratamiento con antibióticos (100% = 200 min). El test estadístico utilizado fue Anova de dos vías, seguido del Test Post Hoc Bonferroni. Las diferencias significativas son indicadas como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, $n=3$.

El análisis del porcentaje de bacteria sobreviviente dentro de los neumocitos a lo largo del tiempo también fue realizado en las mutantes *hk01*, *hk02*, *hk03*, *hk04*, *hk06*, *hk07*, *hk08*, *hk10*, *hk11* y *hk13*, en las cuales no se exhibieron diferencias con la cepa salvaje (**Fig. 9**), sugiriendo no tener un rol activo en los mecanismos de permanencia intracelular.

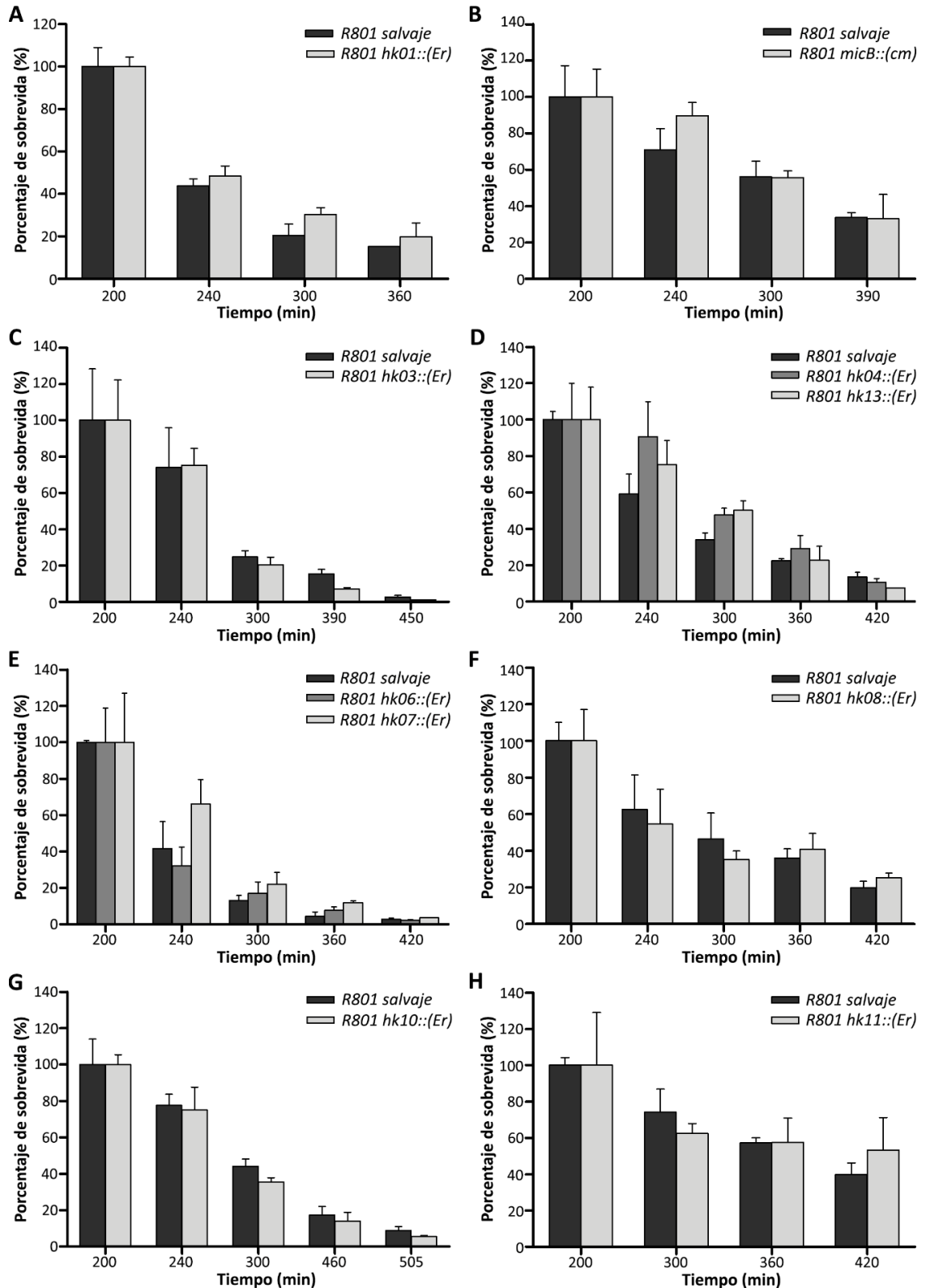


Fig. 9. Las mutantes *hk01*, *micB* (*hk02*), *hk03*, *hk04*, *hk06*, *hk07*, *hk08*, *hk10*, *hk11* y *hk13* no están involucradas en los mecanismos de sobrevivida de neumococo.

Células A549 fueron infectadas con las mutantes *hk01* **A**), *rr02* (*micB*) **B**), *hk03* **C**), *hk04* **D**), *hk06* y *hk07* **E**), *hk08* **F**), *hk10* **G**), *hk11* **H**) y *hk13* **D**), durante 180 min. Posteriormente, los cultivos se incubaron con antibióticos extracelulares por 200, 240, 300, 360 y 480 min. Al tiempo correspondiente las células se lisaron para permitir en recuento intracelular por diluciones seriadas en placas. El porcentaje de sobrevivida intracelular en cada punto fue referido a la cantidad de bacteria que ingresó inmediatamente luego del tratamiento con antibióticos (100% = 200 min). El test estadístico utilizado fue ANOVA de dos vías, seguido del Test Post Hoc Bonferroni, $n=3$.

2.2 Profundización de los mecanismos que involucran a ComE y CiaRH en la sobrevivida intracelular.

En neumococo, la autólisis se desencadena por el desarrollo de competencia a pH 7,8 y es regulada por el TCS ComDE (Claverys *et al.*, 2009). Asimismo, en nuestro laboratorio se ha descrito que el estrés ácido también es capaz de inducir autólisis en *S. pneumoniae* cuando se incubaba durante más de una hora a pH 5,9, y este proceso fue denominado *Lisis Inducida por Estrés Ácido* (ASIL, por sus siglas en inglés) (Pinas *et al.*, 2008). Por otro lado, en algunos patógenos la capacidad de sobrevivir en condiciones ácidas está dada por un mecanismo denominado *Respuesta de Tolerancia al Ácido* (ATR, por sus siglas en inglés), un fenómeno por el cual la tolerancia de un organismo a un pH letal aumenta como consecuencia de una exposición previa a un pH subletal (Cotter *et al.*, 2003). Martin-Galiano *et al.* (2005) demostraron que una subpoblación de neumococo fue capaz de sobrevivir a un pH letal de 4,4 cuando células en fase logarítmica de la cepa R6 se incubaron previamente a pH 5,9. Es importante tener en cuenta que ambos mecanismos, ATR y ASIL, tienen una respuesta opuesta a pH 5,9, que es un valor de pH que se encuentra normalmente en endosomas tardíos (Scott *et al.*, 2014), y que neumococo debería enfrentar cuando es endocitado por células del tracto respiratorio.

Al infectar neumocitos, se pudo observar que la carencia de ComE y CiaR alteró la sobrevivida de la bacteria. Para profundizar en la estrategia utilizada por neumococo en su estadio intracelular, y dado que ComE estaría controlando negativamente este mecanismo, se evaluó la capacidad de sobrevivida de la mutante *lytA*, la cual carece de capacidad para autolisar, esperando encontrar un fenotipo intracelular similar al de *comE*, ya que esta última presenta incapacidad de autolisar a pH 5.9. Curiosamente, se vio que la cantidad de bacteria que perdura dentro de la célula cuando se bloquea la autólisis es similar a la cepa salvaje (**Fig. 10A**). Esto indicaría que LytA no es el factor responsable de la muerte intracelular de neumococo, y que el aumento en la sobrevivida observado al suprimir ComE es independiente de la inhibición de autólisis. En consecuencia, el mecanismo de ASIL no estaría cumpliendo un papel protagónico en la muerte de la bacteria dentro de la célula; no obstante, esto sugiere que ComE actuaría como regulador de alguna vía esencial en la sobrevivida bacteriana.

Por otra parte, se conoce que ComE posee un efecto negativo en la regulación de ATR (Cortes, 2013; Cian *et al.*, 2015), por lo tanto el aumento en la sobrevivida de la mutante *comE* podría deberse a un incremento de ATR. Se ha descrito que el mecanismo de ATR se halla regulado por CiaRH dado que en ensayos *in vitro* se observó que mutantes en ambos componentes (*ciaR*, *ciaH*) bloquean la tolerancia a pH 5.9 (Cortes, 2013). Por lo tanto, para determinar si el aumento en la sobrevivida de la mutante *comE* es en respuesta a una mayor tolerancia al estrés ácido, se evaluó el comportamiento intracelular de una doble mutante *ciaR/comE* (**Fig. 10B**). De esta manera, la mutación en ambos sistemas resultó en una menor sobrevivida respecto a la cepa salvaje, bloqueando así el efecto observado cuando se suprimió *comE* únicamente. Estos resultados corroboran la regulación positiva que ejerce CiaR en la sobrevivida de neumococo (**Fig. 8A**) y alude al mecanismo de ATR como estrategia esencial para dicha sobrevivida dentro de neumocitos.

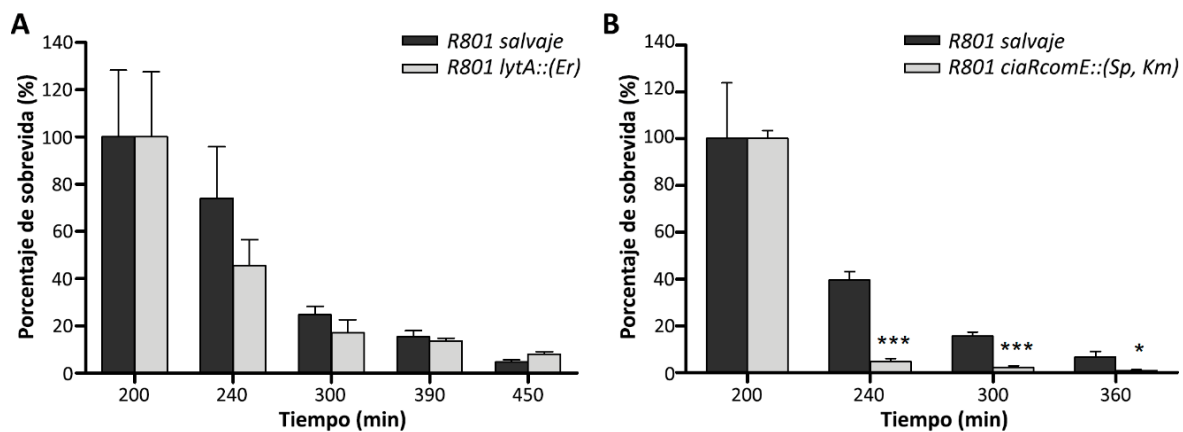


Fig. 10. La capacidad de sobrevivir intracelularmente está dada por la acción de CiaR y la regulación por ComE, a través de de ATR. Células A549 fueron infectadas con las mutantes lytA **A**), y ciaR/comE **B**) durante 180 min. Posteriormente, los cultivos se incubaron con antibióticos extracelulares por diferentes tiempos. Posteriormente las células se lisaron para permitir en recuento intracelular por diluciones seriadas en placas. El porcentaje de supervivencia intracelular en cada punto fue referido a la cantidad de bacteria que ingresó inmediatamente luego del tratamiento con antibióticos (100% = 200 min). El test estadístico utilizado fue Anova de dos vías, seguido del Test Post Hoc Bonferroni. Las diferencias significativas son indicadas como * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, $n=3$.

Capítulo 3. El virus influenza A facilita la sobreinfección con neumococo.

Algunos laboratorios ya han demostrado la existencia de una relación cooperativa entre la infección por el virus influenza A (IAV) y *S. pneumoniae*. Este vínculo se ve favorecido en la nasofaringe, ya que es un sitio común para la colonización de neumococo, como así también para el ingreso y replicación de IAV (Bogaert *et al.*, 2004; Matrosovich *et al.*, 2004). Se ha visto que el virus induce un daño en la célula epitelial que promueve la adherencia bacteriana y reduce la velocidad del movimiento ciliar lo cual dificulta su eliminación (Metzger *et al.*, 2013). En respuesta a la infección viral, el sistema inmune induce además cambios a nivel celular y humoral que debilitan la inmunidad antibacteriana (McCullers, 2006; Shahangian *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2011). La suma de estos efectos individuales resulta en una incrementada susceptibilidad a neumonías neumocócicas secundarias a la infección viral. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno.

3.1 Internalización de *S. pneumoniae* posterior a una infección por IAV.

Diferentes estudios evidencian incremento de los transcritos que codifican para el PAF-R en células infectadas con IAV; este receptor es una de las vías de ingreso a la célula aprovechada por neumococo (van der Sluijs *et al.*, 2006). Por otro lado, la infección previa con IAV incrementa la adherencia de *S. pneumoniae* en células A549, en tráqueas de ratón y chinchilla (McCullers *et al.*, 2003; Plotkowski *et al.*, 1986; Tong *et al.*, 1999). Por esta razón, resulta de interés conocer si la infección viral provoca además de un aumento en la adhesión bacteriana, algún cambio en la internalización de la misma. Se infectaron células A549 durante 1 h, con diferentes MOI de IAV (0; 0,1; 1 y 10). Luego de remover el medio de infección, se agregó medio de cultivo fresco por 1 h adicional, a fin de dar tiempo a los procesos de replicación del genoma viral, transcripción y traducción de proteínas necesarias en el ciclo infectivo. Posteriormente, las monocapas celulares se coinfectaron con *S. pneumoniae* durante 180 min. Con la intención de eliminar las bacterias no internalizadas, las células se incubaron con antibióticos extracelulares por 20 min. A continuación, la lisis celular liberó las bacterias intracelulares, posibilitando su recuento mediante siembra en placas.

Se observó que la infección previa con IAV incrementa la cantidad de bacteria que ingresa a la célula hospedadora en una manera dependiente de la dosis viral (**Fig. 11**). La internalización de neumococo en células epiteliales en ausencia de virus, es también dependiente de la MOI; sin embargo, la mera presencia viral incrementa notablemente el ingreso de bacteria en la célula hospedadora (**Fig. 11**), confiriéndole un beneficio a la infección bacteriana.

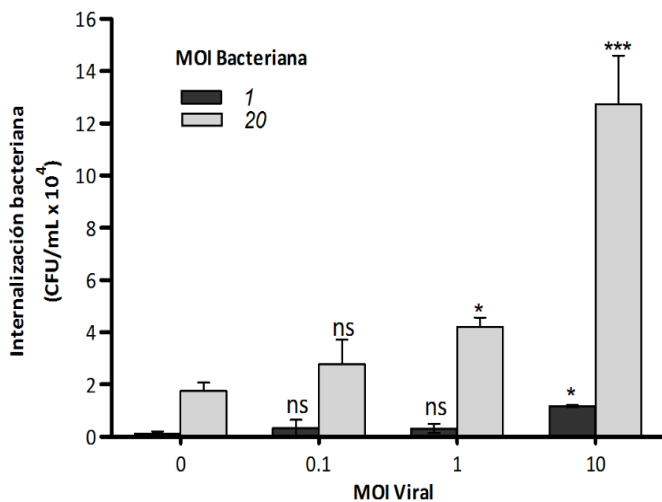


Fig. 11. La internalización de *S. pneumoniae* aumenta en presencia de Influenza A.

Cultivos de neumocitos A549 fueron infectados con PR8 y luego con R801. Seguidamente, las células se lisaron para recuperar las bacterias que habían sido internalizadas antes de la adición de antibióticos extracelulares por 20 min. La cuantificación se llevó a cabo mediante recuento en placas por diluciones seriadas. El test estadístico utilizado fue Anova de dos vías, seguido del Test Post Hoc Bonferroni. Las diferencias significativas son indicadas como * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, y fueron calculadas respecto al grupo control (t_0 para cada MOI respectivamente).

3.2 Modelo celular de coinfección con IAV: selección de la MOI viral apropiada.

La infección viral genera ciertas modificaciones en la célula infectada que podrían ser detectadas por la bacteria, resultando en un beneficio en su estadía intracelular. La adaptación del modelo de infección previamente establecido a un esquema de coinfección permitiría evaluar la existencia de mecanismos moleculares cooperativos entre ambos patógenos. Brevemente, el esquema de infección con neumococo en células A549 (ver Capítulo 1) consiste en la infección de monocapas de células en cultivo con una relación establecida de bacterias, durante 3 h. Posteriormente, la remoción de los neumococos no internalizados se realiza utilizando antibióticos extracelulares (gentamicina, penicilina) que no penetren las membranas celulares. Para comparar la sobrevivencia bacteriana en presencia o ausencia de infección viral, es necesario establecer la MOI viral óptima, puesto que es imprescindible la viabilidad de las células hospedadoras, en cuyo interior se alojarán las bacterias a ser cuantificadas posteriormente.

Con el objeto de escoger la MOI viral óptima para los ensayos, se llevaron a cabo estudios de coinfección en neumocitos tipo II. Primeramente se infectaron células A549 utilizando diferentes MOI virales (1, 5 y 10) de la cepa A/PuertoRico/8/34 (H1N1), también llamado PR8. Para poder establecer una comparación entre comportamiento intracelular de neumococo en presencia y ausencia de virus, se utilizó MOI bacteriana 20, respetando las condiciones previamente establecidas para la infección con bacteria sólo (ver capítulo 1). Las células doblemente infectadas fueron analizadas luego 60 min (t_0) y 300 min (t_5) post infección bacteriana. Las poblaciones celulares apoptóticas y necróticas se identificaron a través de la marcación con Annexina V y 7AAD, mediante citometría de flujo. Se observó que conforme incrementa la MOI viral, el porcentaje de células viables disminuye a lo largo del tiempo. A t_0 , utilizando MOI 10, se obtuvo tan solo un 50% de las células hospedadoras viables, mientras que la infección con MOI 5 presentó una disminución de la misma magnitud a t_5 (Fig. 12). Por esta razón, se estableció como MOI viral de trabajo 1, es decir, una relación teórica 1:1 entre las partículas virales y las células hospedadoras.

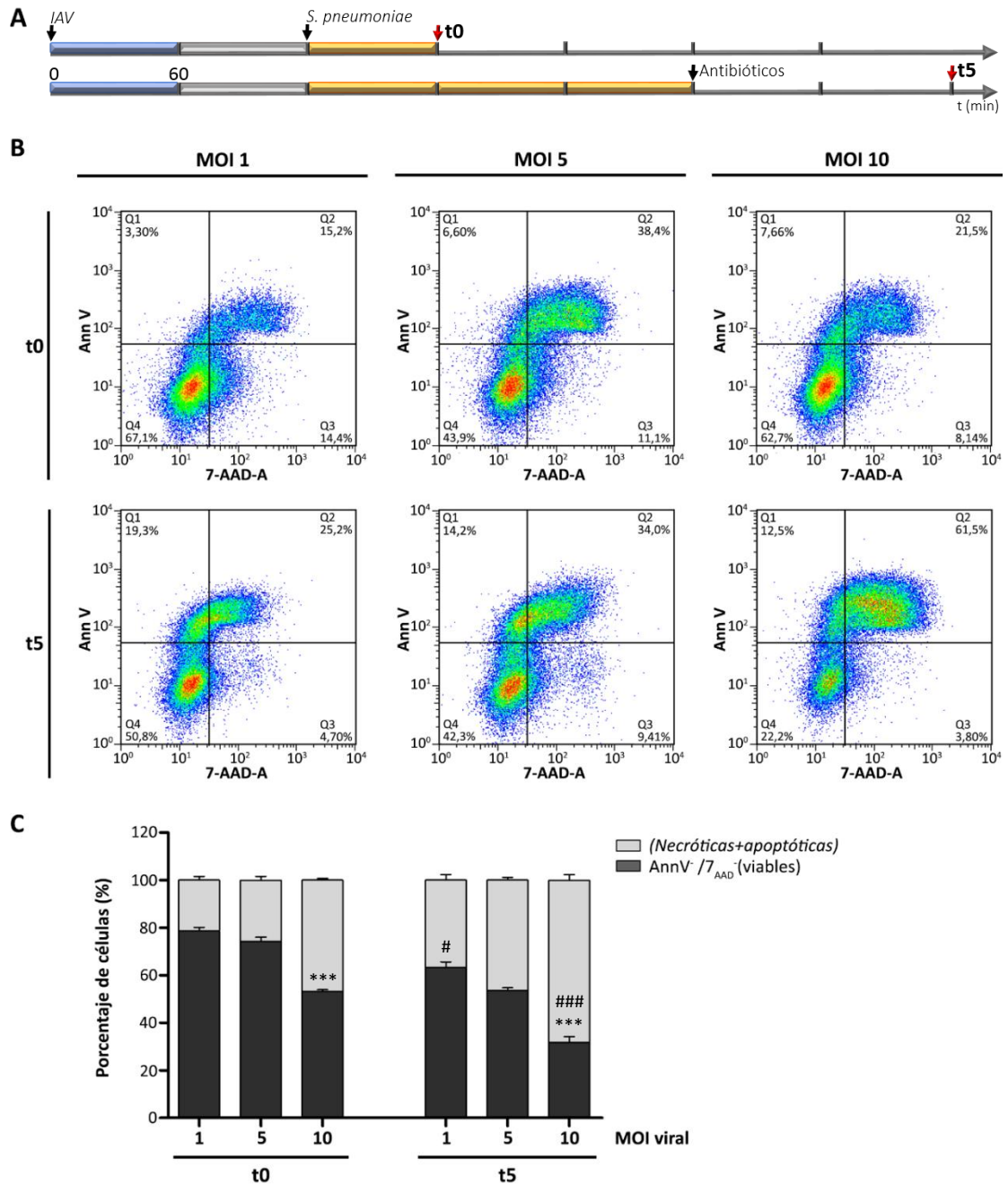


Fig. 12. El incremento de la MOI viral disminuye la cantidad de células viables durante la coinfección de IAV y *S. pneumoniae*.

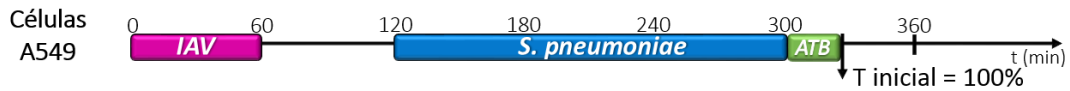
A) Diagrama experimental aplicado para evaluar el impacto en la viabilidad celular luego de la infección con Influenza A y R801.

B) Células A549 fueron coinfectadas con influenza A (cepa PR8) y luego con neumococo (cepa R801). La evaluación de las poblaciones celulares se llevó a cabo luego de 60 min (t0) y a 300 min (t5) post infección bacteriana. Para el análisis por citometría de flujo se utilizaron marcadores de apoptosis (Annexina V) y necrosis (7AAD). Los gráficos de puntos representan la fluorescencia de células positivas para 7AAD (cuadrante inferior derecho), para Annexina V (cuadrante superior izquierdo) y para Annexina V y 7AAD (cuadrante superior derecho [células doblemente positivas]). Los porcentajes de células positivas se muestran en los cuadrantes correspondientes.

C) Análisis cuantitativo de la marcación de células 7AAD y AnnV negativas (viables) y de la suma de las $AnnV^{negativas}/7AAD^{positivas} + AnnV^{positivas}/7AAD^{negativas} + AnnV^{positivas}/7AAD^{positivas}$ (Necróticas + apoptóticas) a diferentes tiempos (t0 y t5) post coinfección con IAV y neumococo en células A549. El 100% de los valores corresponde a 50.000 células analizadas mediante citometría de flujo. Los valores representan la media \pm SD de dos experimentos independientes. El test estadístico utilizado fue ANOVA de dos vías, seguido del Test Post Hoc Bonferroni. Las diferencias significativas son indicadas como *** $p < 0.001$ para las comparaciones intragrupo (respecto a MOI 1 en t0 ó t5); ### $p < 0.001$ para las comparaciones intergrupo respecto del grupo control (respecto a cada MOI viral de t0), $n=3$.

3.3 Sobrevida intracelular de *S. pneumoniae* en presencia de IAV.

Una vez optimizadas las relaciones infectivas de virus y bacteria, como así también los tiempos de infección, se estableció el siguiente modelo de coinfección (**Esquema 11**).



Esquema 11. Modelo experimental de coinfección entre IAV y *S. pneumoniae* en células A549.

De este modo, el estudio se enfocó en indagar si el estímulo observado sobre la internalización de neumococo en células infectadas con IAV podría trasladarse también a un cambio en la sobrevida bacteriana intracelular a lo largo del tiempo. Para ello, se determinó en la cepa salvaje R801 la capacidad de sobrevivir dentro de células previamente infectadas con IAV, respecto a la condición sin virus. Bajo las mismas condiciones de cultivo celular, monocapas de neumocitos previamente infectadas y sin infectar con IAV (*PR8*) fueron enfrentadas con *S. pneumoniae*. Luego de la incubación con antibióticos extracelulares, las células eucariotas se lisaron a diferentes tiempos para recuperar las bacterias sobrevivientes. Los recuentos intracelulares revelaron un incremento en la cantidad de bacterias provenientes de cultivos infectados por IAV, respecto a aquellas en las que neumococo era el único agente infectante (**Fig. 13**). Esto indica que IAV además de estimular la internalización, promueve la permanencia de la bacteria dentro de la célula hospedadora. Así pues, resulta evidente que neumococo percibe alguna condición diferente dentro de la célula infectada con IAV, que lo predispone a una mayor sobrevida intracelular.

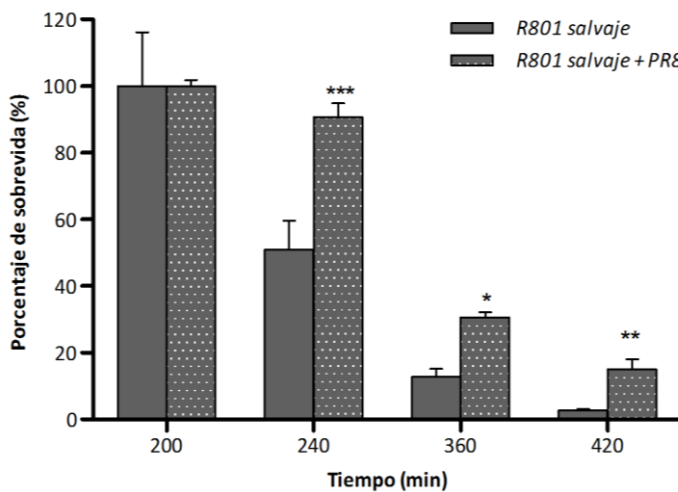


Fig. 13. La infección con influenza A incrementa el tiempo de permanencia intracelular de neumococo.

Cultivos de neumocitos A549 sin infectar e infectados con PR8 fueron incubados con R801 durante 180 min. Seguidamente, las células se lisaron para recuperar las bacterias que habían sido internalizadas, previa adición de penicilina (200 ug/ml) y gentamicina (900 ug/ml) por 20 min. La cuantificación se llevó a cabo mediante recuento en placas por diluciones seriadas. El porcentaje de sobrevida intracelular en cada punto fue referido a la cantidad de bacteria que ingresó inmediatamente luego del tratamiento con antibióticos (100% = 200 min). El test estadístico utilizado fue Anova de dos vías, seguido del Test Post Hoc Bonferroni. Las diferencias significativas son indicadas como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, $n=3$.

3.4 Sistemas de transducción de señales de neumococo involucrados en la percepción de cambios causados por IAV en células A549.

Para intentar comprender de qué manera la bacteria percibe estos cambios celulares producidos por el virus, se estudió la participación de los TCS que posee neumococo para responder frente a diferentes condiciones extracelulares. Debido a que los TCS son los principales sistemas de señalización en neumococo y en particular la función del TCS01 es desconocida, se evaluó el efecto de la mutación de *hk01* en el modelo de coinfección con IAV y neumoco.

Se infectaron células A549 con la mutante *hk01*, las cuales fueron previamente infectadas o sin infectar con IAV, según esquema de coinfección (**Esquema 11**), y posteriormente se determinaron las cantidades de bacterias sobrevivientes a distintos tiempos. El análisis comparativo reveló que la falta de la HK01 impide a la bacteria aumentar su permanencia dentro de la célula hospedadora en presencia de IAV (**Fig. 14**). Estos resultados sugieren que HK01 posee una función destacada en los mecanismos moleculares del sinergismo entre influenza A y *S. pneumoniae*. Por esta razón, se optó por renombrar el TCS01, como VisRH (por Viral Infection Sensing).

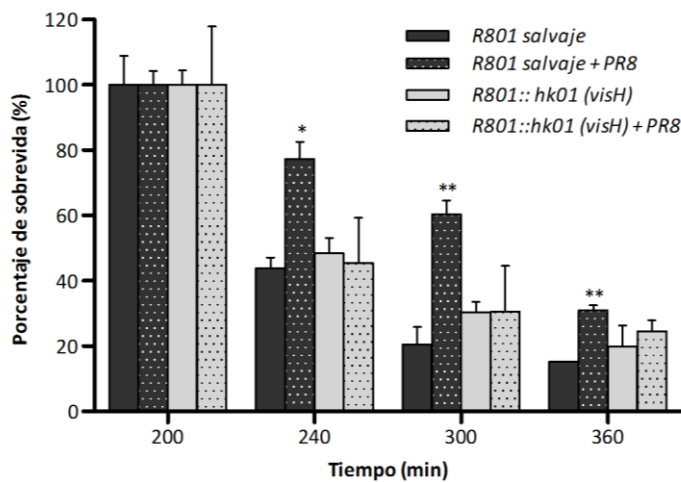


Fig. 14. En presencia de IAV, la mutación en *visH* impide un aumento en la cantidad de bacteria sobreviviente dentro de la célula.

Cultivos de neumocitos A549 infectados y sin infectar con IAV, fueron incubados con la cepa salvaje o la mutante *visH* durante 180 min. Luego del tratamiento con antibióticos extracelulares, las células fueron lisadas en diferentes tiempos para recuperar la población de bacterias intracelulares vivas. La cuantificación se llevó a cabo mediante recuento en placas por diluciones seriadas. El porcentaje de supervivencia intracelular en cada punto fue referido a la cantidad de bacteria que ingresó inmediatamente luego del tratamiento con antibióticos (100% = 200 min). El test estadístico utilizado fue Anova de dos vías, seguido del Test Post Hoc Bonferroni. Las diferencias significativas son indicadas como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, $n=3$.

3.5 Determinación de la señal ambiental percibida por VisH.

En infecciones con *Chlamydia*, se ha descrito que la degradación lisosomal es importante para el aporte de aminoácidos a la bacteria, al punto que el bloqueo de la acidificación en los lisosomas disminuye la supervivencia de la misma (Ouellette *et al.*, 2011). De manera similar, la supervivencia de neumococo también disminuyó cuando las células hospedadoras se trataron con bafilomicina A1 (Fig. 4). Por otro lado, las infecciones virales comúnmente alteran la homeostasis de aminoácidos en las células huésped (Roe *et al.*, 2011; Kummer *et al.*, 2014). Por lo tanto, se hipotetizó que el aporte aminoacídico en la vacuola sería importante para la supervivencia de neumococo y que VisH es necesario para sentir esa perturbación en los niveles de aminoácidos, que eventualmente podría causar IAV. Con el fin de determinar si VisH cumple algún rol en la detección de la concentración intracelular de aminoácidos en el medio, se evaluó el efecto que genera en el crecimiento de la mutante de *visH* la carencia individual de aminoácidos. Para tal fin, se utilizó un medio químicamente definido (MDF), en el que se alternó la carencia de aminoácidos individualmente, y que permitió el monitoreo del crecimiento de la mutante *visH* en las condiciones mencionadas.

Con el fin de simplificar la búsqueda, no se estudió el efecto de aminoácidos esenciales descriptas para neumococo (Arg, Cys, His, Gly, Gln, Ile, Leu, and Val)(Hartel *et al.*, 2012), ya que la bacteria no posee una ruta metabólica para sintetizarlos *de novo*, por lo que fueron agregados siempre al MDF. De este modo, se prepararon medios MDF carentes de Lys, Phe, Pro, H-Pro, Treo, Ser, y se analizó el crecimiento de la mutante *visH*. Las bacterias fueron crecidas en medio completo

(con la adición de todos los aminoácidos) y al llegar a la fase logarítmica ($DO_{600nm} \approx 0,3$) se centrifugaron, se lavaron con PBS y resuspendieron en MDF deficiente de aminoácidos. A partir de ese momento se evaluó el crecimiento, mediante el registro de la DO a lo largo del tiempo. Se observó que la ausencia de Ser imposibilitó el crecimiento bacteriano en mutante *visH*, mientras que la cepa salvaje pudo sobreponerse a esa carencia (Fig. 15). Este hallazgo sugiere que VisH activaría una vía metabólica como respuesta a la falta de serina. Ensayos de crecimiento en MDF preparado con diferentes concentraciones de glucosa no mostraron diferencias entre la mutante *hk01* y la cepa salvaje (Fig. 16). Estos resultados no descartan que VisH pueda sentir perturbaciones en otros metabolitos.

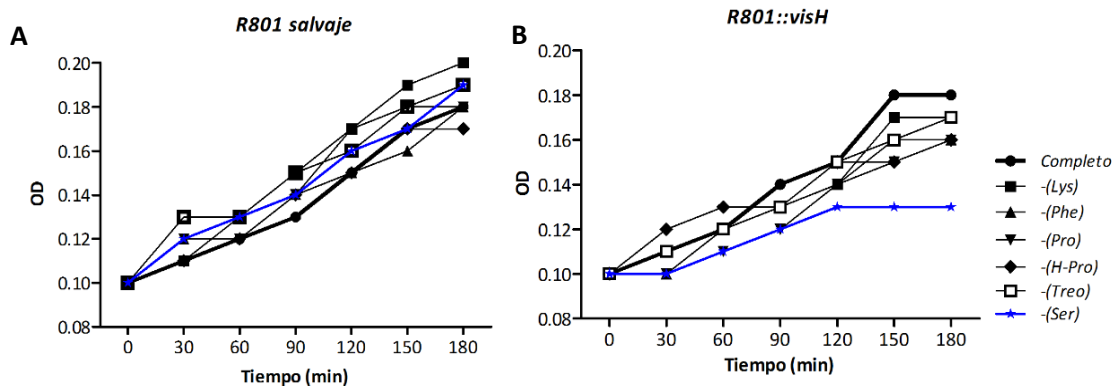


Fig. 15. Curvas de crecimiento en medio MDF deficiente de aminoácidos

Cultivos de la cepa salvaje de neumococo **A)**, y *visH* **B)** fueron crecidos en medio MDF carente de un aminoácido por cada condición. La detección de la densidad de población fue evaluada a lo largo del tiempo mediante la cuantificación de DO_{600nm} . Los datos representan uno de al menos tres experimentos independientes.

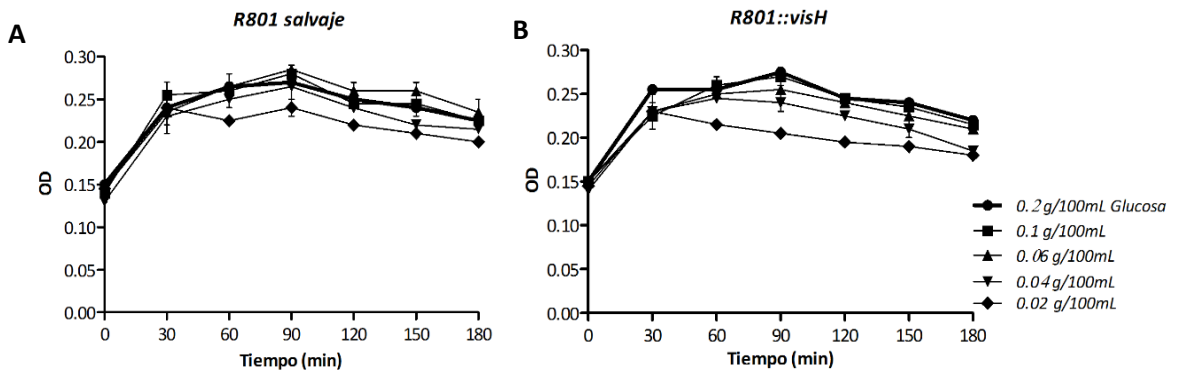


Fig. 16 Curvas de crecimiento en medio MDF con diferentes concentraciones de glucosa.

Cultivos de la cepa salvaje de neumococo **A)**, y *visH* **B)** fueron crecidos en medio MDF con concentraciones diferentes de glucosa por cada condición. La detección de la densidad de población fue evaluada a lo largo del tiempo mediante la cuantificación de DO_{600nm} . Los datos representan uno de al menos tres experimentos independientes.

3.6 El rol de la autofagia en el mecanismo de coinfección con IAV.

La autofagia está implicada en la replicación de ciertos virus, especialmente aquellos que realizan el ensamblado de ARN en la cara citoplasmática de la membrana de las células infectadas. Se ha descrito que la infección por IAV genera un incremento en la cantidad de autofagosomas (Zhou *et al.*, 2009). Por otro lado, también se conoce que este patógeno bloquea la autofagia mediante la inhibición de la fusión de los autofagosomas con los lisosomas (Gannage *et al.*, 2009). Esto conduce a una acumulación perinuclear de vesículas marcadas con la proteína LC3. Por otro

lado, se ha visto que la vía autofágica puede desempeñar diferentes roles frente a infecciones bacterianas. Si bien este mecanismo es uno de los componentes más destacados de la maquinaria de defensa de la célula huésped, ciertas bacterias logran residir dentro de vacuolas autofágicas, mientras que otras sucumben frente a su activación. En este sentido, se analizó por ensayos de Western blots si la infección por *S. pneumoniae* induce un incremento en la conversión de la isoforma LC3-I (citoplasmática) en LC3-II (asociada a membranas), lo que se corresponde con un incremento en la cantidad de autofagosomas (Fig. 6).

Con el fin de evaluar si los mecanismos autofágicos están involucrados en el sinergismo entre IAV y neumococo, se evaluó la conversión de LC3-I a LC3-II en la línea celular A549. Para ello, las células se infectaron con IAV durante 1 h, luego se incubaron por 1 h en medio fresco y se coinfectaron con neumococo durante 1 y 3 h. Luego se lisaron las células y se separaron las proteínas por SDS-PAGE. Mediante análisis de Western blot empleando anticuerpos anti-LC3 y anti- β -Actina (control de carga proteica) se determinaron los niveles de LC3-II, y se observó un incremento de los mismos en las células infectadas por IAV (Fig. 17 [Carril 7 y 8]), indicando un mayor número de autofagosomas durante la infección viral. Este hallazgo concuerda con trabajos previos (Zhou *et al.*, 2009; Gannage *et al.*, 2009), que demuestran la inhibición de la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas. Por otro lado, se evidenció un aumento en la cantidad de LC3-II durante la primera hora de coinfección con IAV y neumococo. Este incremento es aún mayor que el observado en la infección bacteriana (Fig. 17 [carril9 y 10]) o viral (Fig. 17 [carril 7 y 8]) individualmente. Curiosamente, los niveles de LC3-II disminuyen abruptamente a las 3 hs de coinfección (Fig. 17 [carril 11 y 12]), alcanzando niveles basales semejantes a los obtenidos en condiciones de no infección. Estos resultados sugieren que la presencia de IAV en la célula modifica el comportamiento del sistema autofágico hacia una infección secundaria por *S. pneumoniae*, respecto a lo que se observa en las infecciones independientes. A su vez indica que los efectos son dinámicos y dependen del tiempo.

3.7 Rol de VisH en el mecanismo de autofagia durante la coinfección.

Se ha demostrado previamente que VisH está involucrado en la respuesta de la bacteria a los cambios producidos por IAV en neumocitos (Fig. 14). La carencia de la VisH conlleva a una disminución de la capacidad de neumococo de sobrevivir dentro de células A549; sin embargo, no se conoce el papel que cumple esta quinasa en el desarrollo de autofagia, ya sea en células infectadas solamente con neumococo o durante la coinfección IAV/neumococo.

Para abordar este punto, monocapas de células A549 se infectaron con IAV durante 1 h. Luego de 1 h adicional de incubación con medio fresco, los cultivos fueron sobreinfectados con la mutante *visH* durante 1 y 3 hs. Como control, se infectaron cultivos únicamente con *visH* en ausencia de infección viral, siguiendo el mismo esquema cinético. A continuación, los lisados celulares fueron analizados por Western blot, utilizando anticuerpos anti-LC3 y anti- β -Actina.

La infección con *visH* incrementó los niveles de LC3-II por acumulación de autofagosomas de modo similar a la cepa salvaje, sugiriendo que VisH no está involucrada en los procesos autofágicos desencadenados por la infección con neumococo (**Fig. 17** [carril 8]). Sin embargo, en la coinfección con IAV y *visH* los niveles de LC3-II mostraron un incremento que se mantuvo elevado aún a las 3 h de coinfección, de manera opuesta a lo obtenido con la cepa salvaje de neumococo, sugiriendo que la quinasa *visH* estaría vinculada con la disminución de los niveles de LC3-II observados en presencia de virus.

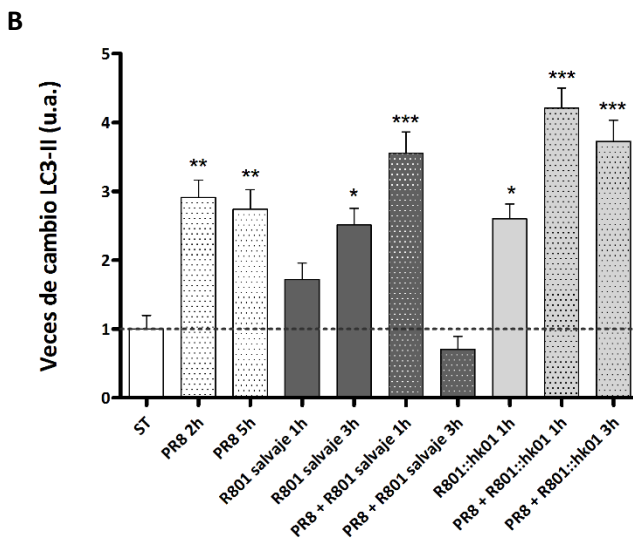
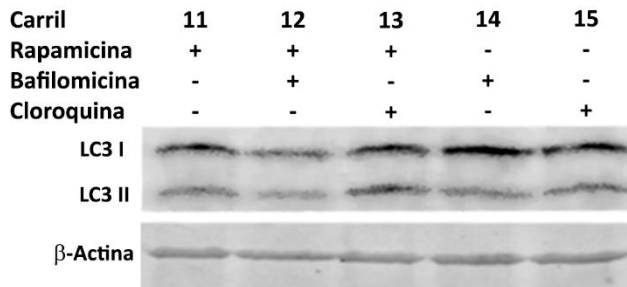
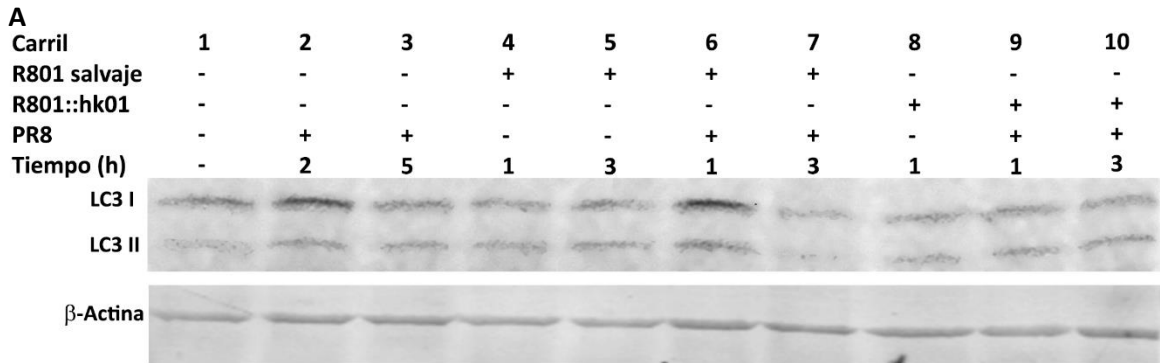


Fig. 17. La autofagia está involucrada en el sinergismo entre IAV y *S. pneumoniae*.

A) Células A549 se incubaron con IAV cepa PR8 por 2 y 5 h (Carriles 2 y 3); con neumococo R801 salvaje por 1 y 3 h (Carriles 4 y 5); *VisH* por 1 h (Carril 8); o en coinfección durante 1 y 3 h (Carriles 6, 7, 9 y 10). Como control se utilizaron células sin tratamiento (Carril 1), o tratadas con Rapamicina (80ug/mL) para inducir autofagia (Carril 11), o Rapamicina e inhibidores de la fusión lisosoma-autofagosoma: bafilomicina A1 (100 nM) (Carril 12 y 14) y Cloroquina (12,5 uM) (Carriles 13 y 15). Las células se lisaron con RIPA y las muestras fueron analizadas por WB utilizando anticuerpos anti-LC3 y anti- β -Actina. **B)** Análisis cuantitativo de los niveles de LC3-II. La intensidad de las bandas se cuantificó usando el programa Odyssey-LI-COR. En cada condición se normalizó LC3-II con β -actina y se representó como veces de cambio respecto a la intensidad de banda en la condición Sin Tratamiento (ST). El test estadístico utilizado fue ANOVA de una vía, seguido del Test Post Hoc Dunnett (Grupo control: ST). Las diferencias significativas son indicadas como * $p < 0.05$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

***S. pneumoniae*: adaptación al medio ambiente y patogénesis**

En humanos, *S. pneumoniae* coloniza la nasofaringe de manera asintomática. El sistema inmune innato y adaptativo generalmente impiden que la colonización progrese a enfermedad. Sin embargo, frecuentemente las alteraciones en la homeostasis huésped-patógeno conllevan a infecciones que amenazan la vida del hospedador. Por lo tanto, es importante comprender la patogénesis infecciosa de neumococo, para lo cual se debe determinar el rol que desempeñan los factores de virulencia involucrados e identificar posibles puntos de intervención para un tratamiento terapéutico.

Diferentes estudios demuestran que la expresión de los factores de virulencia de neumococo se encuentra estimulada por el ambiente y presenta diversas estrategias de regulación que son de gran importancia para la adaptación a nuevos ambientes (Preston *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2010; Patenge *et al.*, 2013). Durante la colonización e invasión, uno de los mecanismos de adaptación bacteriana a nuevas condiciones ambientales es mediante los sistemas de señalización TCS que responden a estímulos externos (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000; Hava *et al.*, 2003). En nuestro laboratorio se identificaron y caracterizaron algunos TCS que contribuyen en los procesos de desarrollo de la infección y la virulencia en *S. pneumoniae*. En particular, se encontró que el sistema MicAB responde a la concentración de oxígeno en el medio, como así también los sistemas CiaRH, ComDE y la serin/treonin quinasa StkP en la inducción del estado de competencia y la virulencia (Echenique *et al.*, 2000; Echenique *et al.*, 2001; Kadioglu *et al.*, 2003; Echenique *et al.*, 2004). Por otro lado, se encontró que el estrés ácido es una condición ambiental capaz de inducir autólisis (ASIL) para asegurar la liberación de ADN, compuestos de la pared celular y factores de virulencia, favoreciendo el intercambio genético y contribuyendo a su patogenia (Pinas *et al.*, 2008). Este mecanismo mediado por el regulador de respuesta ComE, es activado de manera independiente del mecanismo de quorum sensing descrito para la regulación de la competencia, y conlleva a una inducción de lisis bacteriana mediante la autolisina LytA, involucrando en el proceso a StkP (Pinas *et al.*, 2008). Contrariamente, se encontró que CiaRH ejerce un rol protector de la inducción de ASIL (Pinas *et al.*, 2008; Cortes, 2013). En este sentido, CiaRH presenta un papel esencial en la preservación de la integridad bacteriana, a través de la puesta en marcha del mecanismo de tolerancia al estrés ácido (ATR) (Cortes, 2013). Estos hallazgos denotan que neumococo utiliza diferentes mecanismos de señalización que pueden desempeñar un rol distintivo en la patogénesis bacteriana.

Tomando como referencia estos precedentes, surgieron una serie de interrogantes dirigidos por a descifrar el curso intracelular de la infección por neumococo y el papel que cumplen los diferentes mecanismos bacterianos en contexto de relación huésped-patógeno. Por otra parte, el enfoque estuvo también dirigido a esclarecer los eventos celulares y moleculares que forman parte de la sinergia en las etapas iniciales de la coinfección con IAV. Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan evidencias concretas de que neumococo pone en marcha una serie de procesos que le permiten mantener su viabilidad dentro de la célula hospedadora por varias horas, otorgándole un beneficio al proceso infeccioso. La infección también dispara el mecanismo de

autofagia, que responde en defensa de la propia célula. Asimismo, se demuestra que la bacteria es capaz de percibir cambios intracelulares ocasionados por una infección previa con IAV, confiriéndole una ventaja a nivel de internalización y sobrevivencia. Estos hallazgos permiten explicar parte de esta interacción biológica compleja que ocasiona altas tasas de morbi-mortalidad a nivel mundial en los pacientes co-infectados con *S. pneumoniae* e IAV.

Con el fin de dilucidar los mecanismos que *S. pneumoniae* utiliza para invadir y establecer una infección en el huésped, se desarrolló un modelo de infección *in vitro* en cultivos de neumocitos A549 y macrófagos RAW264.7, utilizando ensayos de protección con antibióticos y determinando la internalización y sobrevivencia de neumococo en estas células. Los resultados indicaron que las células RAW264.7 internalizan 50 veces más bacterias que las células A549 (Fig. 3A), lo cual se condice con la función fagocítica profesional de los macrófagos, otorgada por la presencia de receptores en la superficie que detectan patrones moleculares característicos de patógenos (PAMPs) (Navarre *et al.*, 2000). Estos receptores se encuentran ausentes en las células epiteliales (Celli *et al.*, 2002; Bartlett *et al.*, 2008). Por otro lado, en ambas líneas celulares se encontró que la sobrevivencia de las bacterias internalizadas disminuye con el transcurso del tiempo (Fig. 3 B, C). Esto sugiere que podría estar siendo degradada de manera dependiente de lisosomas, a partir del trabajo realizado por Radin *et al.* (2005), en donde un 50% de las bacterias internalizadas mostraba marca positiva para LysoTracker (marcador del compartimento lisosomal), luego de 3 hs post infección. No obstante, en base a los ensayos de sobrevivencia, existe una subpoblación de neumococo que permanece viable intracelularmente durante al menos 5 y 6 h en células RAW264.7 y A549, respectivamente (Fig. 3). La relevancia fisiológica de este hallazgo reside en que la viabilidad intracelular significa una ventaja para neumococo en el proceso de infección. En este sentido, algunas bacterias permanecen alojadas varias horas en el interior de células epiteliales para evadir el sistema inmune del huésped (Wu *et al.*, 2011; Coutanceau *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2003; Hornef *et al.*, 2002), mientras que aquellas que sobreviven dentro de macrófagos pueden diseminarse a otros sitios gracias a la capacidad migratoria de estas células (Pei *et al.*, 2014; Kubica *et al.*, 2008; Moazed *et al.*, 1997). Si bien neumococo permanece varias horas tanto en células A549 como en RAW264.7, el porcentaje de bacterias intracelulares al cabo de 300 min post-infección es aproximadamente un 35 % mayor en células epiteliales (Fig. 3 B, C). Esta diferencia podría estar vinculada con mecanismos degradativos específicos de los macrófagos, como por ejemplo la activación de ROS (Imlay, 2002).

La cuantificación de las UFC provenientes de lisados celulares infectados (Fig. 3B, C), refleja los diferentes procesos intracelulares que acontecen simultáneamente en distintas células del cultivo (replicación intracelular, migración bacteriana hacia el exterior y eliminación por parte del huésped), sin brindar información específica sobre el proceso que experimenta la bacteria en cada célula individualmente. Para diferentes géneros bacterianos, existen evidencias que indican que, luego del evento de invasión, coexisten diversas subpoblaciones de bacterias internalizadas que interactúan de manera diferente con las vías de tráfico vesicular de la célula hospedadora, resultando en múltiples destinos para el patógeno endocitado. Tal es el caso de *Salmonella enterica* (Birmingham *et al.*, 2006; Malik-Kale *et al.*, 2011), *Listeria monocytogenes* (Birmingham *et al.*, 2008) y *Mycobacterium tuberculosis* (Simeone *et al.*, 2012). Es posible reconocer diferentes subpoblaciones de *S. pneumoniae* cohabitando dentro de una misma célula infectada. Por ejemplo, la colocalización parcial con marcadores lisosomales supone un destino degradativo para una

subpoblación internalizada a través de PAF-R (Radin *et al.*, 2005) o por plgR (Asmat *et al.*, 2014). Otra subpoblación de *S. pneumoniae* aprovecha las vesículas Rab11 para alcanzar nuevamente la superficie celular, o hace uso de la transcitosis en células de la microvasculatura cerebral y de pulmón, logrando escapar por la superficie celular basolateral de cultivos polarizados, sin ocasionar daño a la célula hospedadora (Radin *et al.*, 2005; Ring *et al.*, 1998; LeMessurier *et al.*, 2013; Gradstedt *et al.*, 2013). Esto ocurre posiblemente a través de endocitosis mediada por caveolina, eludiendo la vía canónica endosoma-lisosoma (Doherty *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2006; Predescu *et al.*, 2004; Tugizov *et al.*, 2013). En relación a la vía de reciclaje, se conoce que diferentes bacterias utilizan este mecanismo para lograr salir de las células que han infectado, interfiriendo con el tráfico normal de la célula huésped, evitando su detección y degradación (Fredlund *et al.*, 2014; Takeuchi *et al.*, 2011; Barrile *et al.*, 2015). Por consiguiente, la reducción de la cantidad intracelular de neumococo que subsiste luego de la internalización (Fig. 3 B, C), podría deberse a que la bacteria es eliminada dentro la célula huésped o a un escape del patógeno al medio extracelular. En este último caso, la bacteria moriría al entrar en contacto con los antibióticos presentes en el medio de cultivo, por lo que el modelo de infección establecido (Esquema 11) no permite distinguir entre estas dos posibilidades. En este sentido, no se ha reportado que neumococo replique dentro de las células hospedadoras; no obstante, en base al modelo experimental utilizado en este trabajo no se puede descartar tal evento.

También se conoce que ciertas bacterias pueden entrar en un estado viable-no replicante en las células hospedadoras (“*persisters*”), donde logran sobrevivir a los mecanismos de eliminación de la inmunidad innata y muestran tolerancia a los antibióticos. Algunos ejemplos de tales bacterias incluyen *M. tuberculosis* (Bermudez *et al.*, 1999), *E. coli* uropatógena (Mysorekar *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2011), *Chlamydia pneumoniae* (Kern *et al.*, 2009; Buchacher *et al.*, 2014), *Campylobacter jejuni* (Watson *et al.*, 2008; Perez-Boto *et al.*, 2012) y *Haemophilus influenza* (Morey *et al.*, 2011). En el caso de la infección de macrófagos por *Salmonella entérica* serovar Typhymurium (*S. Typhymurium*), se encontró que luego de 2 h de infección la mayoría de las bacterias internalizadas se mantiene en un estado no-replicante, comprobándose que el arresto en el crecimiento es reversible y que la internalización, acidificación y deprivación de nutrientes son inductores de la formación de “*persisters*” intracelulares (Helaine *et al.*, 2014). Considerando estos antecedentes en relación a otras bacterias, cabe la posibilidad de la existencia de esta tercera subpoblación intracelular de *S. pneumoniae*. Por esta razón, trabajos posteriores deberán enfocarse en indagar si el estadio intracelular de neumococo en las células hospedadoras (Fig. 3) es un desencadenante en la formación de bacterias persistentes.

Autofagia y sobrevida de neumococo en neumocitos

Luego de la invasión, la autofagia es un componente clave de la inmunidad innata contra infecciones por diferentes microorganismos. Sin embargo, numerosos patógenos desarrollan estrategias para evadir, bloquear o manipular la progresión normal del proceso autofágico y así establecer una infección exitosa y/o persistente (Vazquez *et al.*, 2010; Cemma *et al.*, 2012; Mostowy, 2014). A raíz del desconocimiento del rol de este mecanismo en la infección por neumococo, se analizó la interacción de esta bacteria con la vía autofágica, para indagar acerca de los eventos celulares y moleculares que permiten a esta bacteria establecer una infección. El incremento en los niveles de LC3-II detectado a tan sólo 60 min post-infección indica un aumento

en la cantidad de autofagosomas (Fig. 6). Dado que el autofagosoma es una estructura intermedia en una vía dinámica, el número de autofagosomas observados en cualquier punto de tiempo específico es una función del equilibrio entre la tasa de su generación y la tasa de su conversión en autolisosomas. Por lo tanto, la acumulación de autofagosomas puede representar ya sea la inducción de la autofagia, o alternativamente, bloqueo de la degradación corriente abajo de la formación de esta estructura. El flujo autofágico puede ser analizado por Western blot, midiendo el incremento de LC3-II en presencia y ausencia de degradación lisosomal. La inhibición de la degradación lisosomal puede lograrse mediante el uso de inhibidores de proteasas (por ejemplo, leupeptina y E64D) o fármacos tales como bafilomicina que alteran el pH lisosomal o por tratamiento con agentes que bloquean la fusión de autofagosomas con lisosomas. Un incremento en los niveles de LC3-II en presencia de inhibidores de proteasas lisosomales, indicaría un aumento del flujo autofágico. Sin embargo, si el nivel de LC3-II permanece sin cambios, es probable que la acumulación de autofagosomas se produzca debido a una inhibición de la degradación; por ejemplo, por un bloqueo de la fusión autofagosoma-lisosoma. Durante el período de escritura de este trabajo, se describió que *S. pneumoniae* induce autofagia a través de la vía PI3K-I/AKT/mTOR (Li, 2015). Estos hallazgos están de acuerdo con lo observado en la infección de células A549 con la cepa R801 (Fig. 6) y refuerzan la hipótesis de que el mecanismo de autofagia cumpliría un rol citoprotector en la infección por neumococo.

Otro aspecto interesante en este mecanismo es la identificación del evento desencadenante de la respuesta autofágica. En relación a este punto, sería necesario evaluar si la bacteria escapa del fagosoma al citosol, dado que este proceso podría ser una causa que active la autofagia. Al respecto, se ha descrito que neumococo, a través de su hemolisina principal (Ply), desencadena un mecanismo de permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) en macrófagos infectados (Bewley *et al.*, 2011; Bewley *et al.*, 2014; Lemon *et al.*, 2015). Además, se conoce que neumococo es capaz de activar los receptores citoplasmáticos Nod2, sugiriendo fuertemente que la bacteria accede al citoplasma de la célula infectada (Opitz *et al.*, 2004; Dorrington *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Sería necesario corroborar si este proceso también ocurre en células epiteliales, y por ende si es la causa de la activación de la autofagia. Estudios dirigidos a elucidar en detalle la biología celular del proceso permitirán una mayor comprensión del impacto de la autofagia en el mecanismo de patogénesis de neumococo.

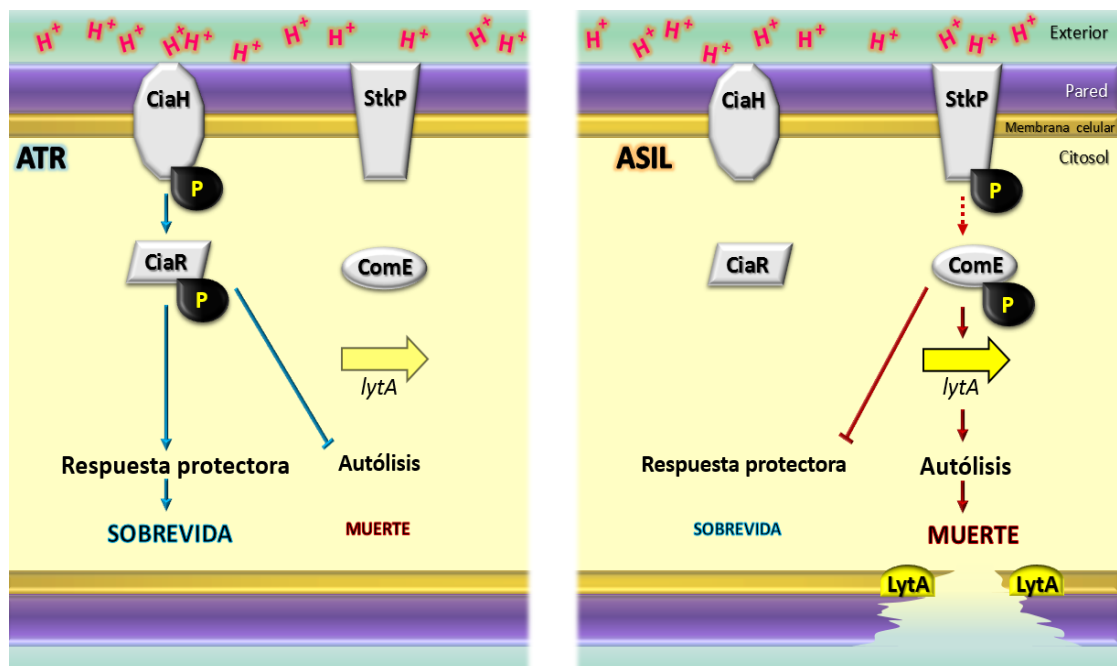
Internalización y vida intracelular de neumococo

Algunos microorganismos son capaces de establecer un diálogo molecular extraordinariamente sofisticado con la célula huésped, a fin de manipular las vías de transducción de señales y efectuar una serie de eventos que van desde su propia endocitosis hasta la evasión de los mecanismos de degradación (Cossart *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2010). Con el objeto de evaluar qué factores celulares podrían jugar un rol esencial en la patogénesis de la infección, se analizó el efecto del pH de los compartimientos endosomales en relación a la supervivencia o muerte de neumococo. Contrariamente a lo esperado, el tratamiento con inhibidores de la acidificación lisosomal en las células infectadas causó una disminución significativa en la supervivencia intracelular de neumococo (Fig. 4), sin afectar el crecimiento bacteriano *in vitro* o la viabilidad de las células huésped (Fig. 5). Esto indica que la acidificación es necesaria para la persistencia de neumococo dentro de la célula, posiblemente porque un pH bajo activa ciertos mecanismos o de factores de patogenicidad

bacterianos. Diferentes procesos podrían ser desencadenados por el pH ácido; por ejemplo, numerosas toxinas bacterianas requieren de la acidificación para su procesamiento y activación dentro de la célula diana, mientras que su efecto es impedido por el tratamiento con bafilomicina A1 o NH₄Cl (Qa'Dan *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2000; McClain *et al.*, 2000). En el caso de *Francisella tularensis* la acidez es requerida para liberar el hierro de la transferrina, ya que este metal esencial para su crecimiento (Fortier *et al.*, 1995). El pH ácido es una señal que conduce a *S. Typhimurium* a una mejor adaptación al entorno intracelular (Foster *et al.*, 1999; Foster, 1999; Bearson *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 2009). En este sentido, *S. pneumoniae* posee mecanismos de resistencia al estrés ácido (ATR), con los cuales puede hacer frente a un descenso en el pH extracelular *in vitro* (Martin-Galiano *et al.*, 2005). Investigaciones previas en nuestro grupo de trabajo revelaron el involucramiento de los TCS CiaRH y ComE en el desarrollo *in vitro* de ATR (Pinas *et al.*, 2008; Cortes, 2013). Mientras que ComE activa el mecanismo de lisis en medio ácido (ASIL), se ha visto que CiaRH ejerce un rol protector frente a este proceso (Pinas *et al.*, 2008). La inducción del mecanismo de ATR, por incubación de cultivos de neumococo en medios de cultivo a pH ácido subletal, demostró que las mutantes *ciaR* y *comE* afectan de manera antagónica el desarrollo de ATR. Mientras que en la mutante *ciaR* se inhibió el mecanismo de tolerancia al pH ácido, *comE* favoreció su desarrollo, funcionando como un regulador negativo, en favor de la muerte bacteriana (Cortes, 2013). En consecuencia, la inhibición de la acidificación mediante el tratamiento con bafilomicina A1 imposibilita la puesta en marcha de este mecanismo de protección al estrés ácido, lo que permite explicar la disminución en la sobrevida intracelular de neumococo en células que recibieron este tratamiento (Fig. 4). En el presente trabajo se realizaron ensayos *in vivo* para evaluar si ASIL o ATR están involucrados en la sobrevida o muerte de neumococo dentro de la célula eucariota, dado que la transición de un endosoma temprano a un fagolisosoma es acompañada por una caída del pH por debajo de 5.0, exponiendo a la bacteria a una acidificación gradual (Huotari *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2006; Gradstedt *et al.*, 2013). La evaluación de la sobrevida intracelular en células A549 mostró que las mutantes *ciaR* y *comE* presentan fenotipos opuestos en relación a la viabilidad a lo largo del tiempo (Fig. 8A, B). La ausencia del regulador de respuesta CiaR disminuyó la sobrevida de neumococo dentro de la célula infectada, mientras que la carencia de ComE incrementó el porcentaje de bacterias intracelulares. Esto demuestra que CiaRH y ComE están implicados en los mecanismos bacterianos que determinan su supervivencia (ATR) o suicidio (ASIL), dentro de la célula hospedadora. Más aún, células infectadas con la doble mutante *ciaRcomE* presentaron el mismo perfil de sobrevida que la simple mutante *ciaR* (Fig. 10B). Esto demuestra un efecto dominante de CiaRH sobre ComE. El incremento en la sobrevida intracelular que presentó la mutante *comE* podría estar asociado a un bloqueo en de la autólisis mediada por ASIL. Sin embargo, la infección de las células A549 con la mutante *lytA* mostró el mismo perfil intracelular que la cepa salvaje (Fig. 10A), indicando que la activación de la autólisis no es el factor de muerte de neumococo dentro de las células. Esto pone en evidencia que el incremento en la sobrevida intracelular observado en la mutante *comE* se debe a la desinhibición del mecanismo de ATR al eliminarse la regulación negativa de ComE sobre este proceso, y no por un bloqueo de ASIL (**Esquema 12**).

La identificación de los factores necesarios para la supervivencia intracelular de neumococo permite una valoración de la importancia de las etapas intracelulares en la infección, y también ayuda a comprender las estrategias de persistencia empleadas en los organismos hospedadores. Si bien se determinó que CiaRH y ComE son parte de los mecanismos de respuesta a las condiciones

de estrés ácido, también se evidenció que otros TCS están involucrados en la adaptación a compartimientos intracelulares hostiles. Tal es el caso de RitR (Fig. 8C), cuya mutación redujo su capacidad de supervivencia intracelular comparado con la cepa salvaje, indicando que esta proteína cumple un papel importante en la mantención de la viabilidad bacteriana dentro de la célula infectada. Se ha visto que la delección del gen *ritR* provoca una reducción marcada en los recuentos bacterianos en modelos de neumonía murina (Throup *et al.*, 2000; Ulijasz *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta el momento la importancia de RitR en la virulencia no había sido demostrada intracelularmente (Fig. 8C). Este hallazgo podría estar vinculado a un desbalance en la homeostasis de hierro dentro de la bacteria, ya que se ha visto que RitR es un represor del sistema de captación de hierro *piu*, por unión directa a su promotor (de allí su nombre, por sus siglas en inglés: “*Regulator of Iron Transport*”) (Ulijasz *et al.*, 2004; Ulijasz *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2013). Además, regula la expresión de varios genes implicados en la resistencia al estrés oxidativo, por ejemplo el gen que codifica para la proteína Dpr (“*Dps-like-peroxide resistance protein*”), capaz de proteger la célula contra hierro y peróxido (Pulliainen *et al.*, 2003). El hierro (II) es un causante de estrés oxidativo, especialmente en combinación con peróxido de hidrógeno, ya que esto conduce a la producción de radicales oxhidrilos a través de la reacción de Fenton (Imlay *et al.*, 1988; Pesakhov *et al.*, 2007). En *S. pneumoniae*, la demanda de hierro es limitada, ya que carece de una cadena respiratoria y por lo tanto no posee citocromos; aun así el hierro es necesario en bajas concentraciones para la formación de enzimas que contienen grupos FeS, incluyendo la ribonucleótido reductasa anaeróbica (Lanie *et al.*, 2007). Este hallazgo puede contribuir a futuros estudios orientados a describir en detalle las estrategias bacterianas en condiciones de oxidación y la evaluación de



Esquema 12. Modelo de respuesta al estrés ácido en *S. pneumoniae*. Frente a un mismo estímulo ambiental, neumococo presenta fenotipos diferentes y opuestos. La exposición a un pH ácido subletal activa un mecanismo de tolerancia al estrés ácido (ATR), mediado por el sistema *ciaRH* que favorece la supervivencia de la bacteria. De manera antagónica, las condiciones de estrés ácido neumococo pueden activar un mecanismo de muerte bacteriana (ASIL) mediado por *ComE*, resultando en la lisis bacteriana por activación de *LytA* (Piñas, 2008). El desarrollo de una de estas vías inhibe a la otra, mientras que *CiaRH* es esencial para el desarrollo de ATR, *ComE* ejerce un control negativo sobre el mismo. Por el contrario, *ComE* es clave en la inducción de ASIL, mientras que *CiaRH* cumple un rol protector de la lisis por estrés ácido.

posibles interconexiones entre diferentes vías de señalización como estrategias de supervivencia bacteriana dentro de compartimentos intracelulares.

Otro componente de un sistema de señalización involucrado en la adaptación intracelular de neumococo es la quinasa del TCS09. La mutante *hk09* aumentó la supervivencia de neumococo dentro de la célula hospedadora (Fig. 8D), hecho que le asigna una función de regulador negativo en la supervivencia bacteriana. Se conoce que la eliminación del gen regulador de respuesta *rr09* ocasiona diferentes fenotipos de virulencia de una manera dependiente de cepa (Blue *et al.*, 2003). Por esta razón, estudios posteriores deberán orientarse a determinar si el incremento de la supervivencia intracelular en mutantes *hk09* se debe a razones vinculadas a la cepa, o bien si la histidín quinasa reprime algún componente que desencadena la muerte de la bacteria en cepas salvajes, independientemente del TCS09.

Luego de la adhesión bacteriana a la superficie celular, ocurren eventos de transducción de señales dinámicos, tanto en las células hospedadoras como en la bacteria invasora, con el fin de lograr la internalización del patógeno. En este trabajo se determinó que la ausencia de MicB, HK03, HK04, HK06, HK11, ComE y RitR altera la internalización bacteriana a células A549 (Fig. 7), demostrado que estos componentes de los sistemas de señalización bacteriana forman parte del mecanismo de entrada de neumococo a la célula huésped. Las mutantes *micB*, *hk03*, *hk04*, *hk06*, *hk11* tienen un rol activo en la internalización, pero no están implicadas en la supervivencia intracelular a lo largo del tiempo, sugiriendo que las vías de señalización que activa la bacteria en la entrada a la célula no son necesariamente las mismas que requiere para sobrevivir. La menor internalización de las mutantes *hk04* y *hk06* en comparación con la cepa salvaje (Fig. 7) puede estar asociada a un defecto en la adhesión bacteriana a la célula diana, ya que los sistemas TCS04 y TCS06 regulan la expresión de las adhesinas PsaA, PspC y PspA (McCluskey *et al.*, 2004; Standish *et al.*, 2007). Por lo tanto, una adherencia deficiente conllevaría a una disminución en el número de bacterias capaces de ingresar a la célula hospedadora. Por otra parte, la mutante *hk11* también presenta menor internalización en comparación a la cepa salvaje (Fig. 7). Se ha descrito que un incremento en la expresión de *hk11* y *rr11* en neumococo, aumenta la formación de biofilms (Cockeran *et al.*, 2014; Mutepe *et al.*, 2013). Las etapas tempranas en la formación de estas biopelículas involucra eventos de adhesión a superficies (Ma *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2014). De esta manera, la escasa internalización observada en la mutante *hk11* podría estar vinculada a dificultades en la adherencia. Las mutantes en otros componentes de los TCS también alteran la internalización bacteriana: mientras que *micB* y *ritR* la disminuyen, *hk03* y *comE* la incrementan (Fig.7). Estas proteínas participan en diferentes procesos como regulación de competencia, regulación de los niveles de hierro, quorum-sensing, ASIL y ATR (Echenique *et al.*, 2000; Ulijasz *et al.*, 2004; Pinas *et al.*, 2008; Cian *et al.*, 2015). Estudios futuros deberán estar orientados a determinar el involucramiento de estos procesos en la internalización, o si funciones aún no descritas de MicB, HK03, ComE y RitR explican las alteraciones en el ingreso de la bacteria a la célula.

Sinergismo entre influenza A y *S. pneumoniae*

Hasta el momento de realización de esta tesis, se había constatado la existencia de una asociación cooperativa entre en *S. pneumoniae* y el virus influenza A (IAV) (McCullers *et al.*, 2002; McCullers, 2006). Durante las tres principales pandemias de IAV (1918, 1957 y 1968), la mayoría de

las muertes no se debieron a la infección viral primaria, sino que la mayoría de los individuos sucumbieron ante una infección bacteriana secundaria, predominantemente causada por neumococo (Morens *et al.*, 2008; Chien *et al.*, 2009). En los últimos años ha surgido nueva evidencia sobre los mecanismos subyacentes de esta interacción entre los patógenos. Muchos estudios han descrito mecanismos de virulencia sinérgicos basados en modelos de ratón en donde IAV y *S. pneumoniae* son simultáneamente inoculados directamente en el tracto respiratorio inferior (McCullers, 2006; Diavatopoulos *et al.*, 2010). Se ha profundizado el análisis en relación con los defectos ocasionados por el virus en la inmunidad antibacteriana, ya sea a nivel de daño celular (Ghoneim *et al.*, 2013; Wolf *et al.*, 2014; Blevins *et al.*, 2014; Kosai *et al.*, 2011), y en la respuesta pro-inflamatoria (Cao *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; LeMessurier *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2008). A pesar de todos estos antecedentes, existen muy pocos estudios orientados a dilucidar los procesos de patogénesis infecciosa a nivel celular.

En el presente trabajo hemos evaluado la implicancia de la acidificación y los sistemas de señalización bacterianos en el contexto de la invasión de neumococo a células eucariotas, como así también los efectos de la coinfección con IAV sobre estos mecanismos. Demostramos que la infección previa con IAV favorece la internalización de neumococo, ya que bajo las mismas condiciones de infección, las células que fueron infectadas con diferentes MOI viral alojaron un mayor número de bacterias en comparación con la condición sin virus (Fig. 11). Este hecho demuestra la existencia de un beneficio a nivel celular en la relación simbiótica entre bacteria y virus. Se ha descrito que la infección viral produce un incremento en la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular, como también la exposición de receptores ocultos que conllevan a una mayor adherencia bacteriana, lo cual podría explicar el incremento en la internalización (Nita-Lazar *et al.*, 2015; Peltola *et al.*, 2004; McCullers, 2006; McCullers *et al.*, 2003). De igual manera, se demostró que la presencia de IAV favorece la supervivencia intracelular de la bacteria, prolongando su viabilidad a lo largo del tiempo (Fig. 13). En este sentido, se conoce que las infecciones virales afectan en gran medida al metabolismo celular, por ejemplo, los virus con envoltura incrementan la síntesis *de novo* de los lípidos de membrana como consecuencia de la gemación viral (Janke *et al.*, 2011). En particular, IAV altera el metabolismo de la glicólisis y de las pentosas-fosfato, e incrementa la actividad catalítica de diferentes enzimas que forman parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la glutaminólisis (Janke *et al.*, 2011; Ritter *et al.*, 2010; Klemperer, 1961). Un desbalance en las cantidades de aminoácidos intracelulares podría alterar los niveles de proteasas que son claves en la defensa anti-bacteriana. Por consiguiente, una disminución en la concentración de aminoácidos como consecuencia de la infección viral, podría ser la causa del aumento en la sobrevivencia intracelular de neumococo en presencia de IAV. Particularmente, se encuentra descrito que ciertas proteasas celulares cumplen un rol importante en la muerte de neumococo (Standish, 2009 #5950)(Hahn, 2011 #7831). Por lo tanto, estudios futuros deberán estar orientados a determinar los niveles de aminoácidos y proteasas en células infectadas con IAV contribuirán a elucidar el mecanismo por el cual el virus favorece la sobrevivencia de neumococo en la célula huésped.

Hasta el momento, los estudios precedentes acerca del sinergismo entre ambos patógenos fueron reportados considerando diferentes perspectivas y modelos animales. No obstante, no se habían contemplado estudios a nivel celular que describan los mecanismos cooperativos de la interacción. La utilización de un modelo celular permitió evaluar la relevancia de la infección viral en la sobrevivencia intracelular de neumococo. Este hallazgo es significativo, dado que se encontró el

doble de bacterias intracelulares luego de la infección viral (Fig. 13), indicando también que neumococo es capaz de mantenerse vivo por más tiempo dentro de la célula hospedadora. Estos resultados muestran una correlación con lo observado en diferentes modelos animales, donde la infección viral incrementa la sobrevivencia de neumococos recuperados de diferentes órganos, exacerbando la patogenicidad y provocando mayor morbi-mortalidad en los animales coinfectados (Kash *et al.*, 2015; Short *et al.*, 2011; McCullers *et al.*, 2002).

El estudio de la asociación a nivel celular entre *S. pneumoniae* e IAV es importante para diseñar estrategias de intervención terapéuticas más eficaces que reduzcan el impacto de las infecciones bacterianas secundarias. Para generar nuevas alternativas en el desarrollo de antimicrobianos, es fundamental la caracterización de los STS involucrados en la interacción entre neumococo, IAV y el hospedador. La capacidad de detectar y responder a las variaciones ambientales es una propiedad esencial para la supervivencia bacteriana. En los TCS, las HK son las responsables de percibir estímulos extracelulares y activar cascadas de señalización que permiten la adaptación bacteriana a las nuevas condiciones del ambiente (Jung *et al.*, 2012). Mientras que la sobrevivencia de la cepa salvaje de neumococo es mayor en células infectadas con IAV que en células no infectadas previamente con IAV, la mutante *visH* no presenta diferencias significativas de sobrevivencia en células infectadas o sin infectar con el virus (Fig. 14). Los resultados obtenidos indican que la mutación en la quinasa VisH de neumococo le confiere una limitada capacidad de supervivencia dentro de células infectadas con IAV, alcanzando porcentajes similares a la cepa salvaje en células sin infectar con IAV (Fig. 14). Este hallazgo demuestra que VisH cumple un rol importante en el sinergismo entre ambos patógenos, ya que los resultados muestran que esta proteína favorece la sobrevivencia intracelular de neumococo cuando el hospedador está infectado con IAV pero no en células no infectadas por el virus.

VisH percibe el nivel extracelular de serina y está involucrada en la biosíntesis bacteriana de ese aminoácido.

Se observó que el crecimiento de la mutante *visH* en medio de cultivo químicamente definido disminuye en ausencia de serina (Fig. 15). Esto indicaría que la quinasa VisH forma parte de una vía regulatoria que neumococo activaría en respuesta al déficit de este aminoácido (Fig. 15). Este hallazgo abre las puertas a la caracterización de la cascada de señalización que activa neumococo durante la coinfección, ya que el sistema VisRH no se encuentra aún descrito bioquímica y funcionalmente. Investigaciones futuras deberán estar orientadas a identificar los elementos que forman parte de esta señalización iniciada por VisH, por ejemplo la identificación del regulador de respuesta asociado a esta vía de señalización. Conocer en detalle estos mecanismos bacterianos contribuirá a ampliar las estrategias en cuanto a desarrollo de nuevos tratamientos paliativos y/o preventivos.

En este contexto, se postula que la reducción en la sobrevivencia intracelular de *visH* en células coinfectadas con IAV podría ser ocasionada por una disminución en los niveles de serina como consecuencia de la infección viral. La carencia de esta histidín quinasa imposibilitaría la compensación intracelular de los niveles de este aminoácido, conllevando a una afectación en la viabilidad de la mutante.

El rol de autofagia en el mecanismo sinérgico entre IAV y *S. pneumoniae*

Se conoce que el mecanismo de autofagia se activa mediante la privación celular de nutrientes, en especial de aminoácidos (Fader *et al.*, 2014; Meijer *et al.*, 2014). En el caso de IAV, estudios recientes reportaron que la infección viral no sólo promueve la formación de autofagosomas, sino que también previene los últimos eventos en su maduración, bloqueando la fusión autofagosoma-lisosoma (Gannage *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Zhirnov *et al.*, 2013). En concordancia con estos antecedentes, se observó un incremento del contenido de LC3-II en las células A549 infectadas con IAV luego de 2 y 5 hs (Fig. 17), lo que indica que el mecanismo autofágico está activo durante la infección viral, posiblemente como consecuencia de una privación intracelular de aminoácidos. A 1 h de infección con neumococo en células previamente infectadas con IAV, se observó un incremento mayor de los niveles de LC3-II en comparación con la infección de ambos patógenos por separado, indicando que IAV y neumococo contribuyen cooperativamente al aumento de la cantidad de autofagosomas (Fig. 17). Sin embargo, luego de 3 h de coinfección, el fenómeno se revierte disminuyendo la cantidad de LC3-II a los niveles encontrados en células no infectadas (Fig. 17). Este resultado evidencia que el sinergismo entre ambos patógenos altera el contenido de LC3-II en la célula de manera dinámica. Por otra parte, la disminución de LC3-II a las 3 h de coinfección podría ser responsable del incremento de la sobrevivencia bacteriana en presencia del virus (Fig. 14). Por lo tanto, se postula que frente a la infección por *S. pneumoniae* la autofagia tiene un rol citoprotector, y este efecto se ve inhibido por la infección previa con IAV provocando un incremento en la sobrevivencia bacteriana cuando virus y bacteria infectan la misma célula. En relación a la inhibición autofágica llevada a cabo por IAV, se conoce que la proteína viral M2 se une a Beclina1, la cual es requerida para la maduración de los autofagosomas, y de esta manera bloquea la fusión de membranas de los autofagosomas con los lisosomas. Además, recientemente se describió que el motivo LIR presente en M2 ocasiona en el momento de la gemación viral una relocalización de LC3 en la membrana plasmática de las células infectadas (Beale *et al.*, 2014; Munz, 2014). Por lo tanto, como IAV intercepta la maquinaria autofágica para proporcionar los recursos adecuados para la gemación y estabilidad viral, sería indispensable conocer en detalle qué efectos ocasiona esta manipulación al sistema autofágico en la coinfección con neumococo. Estudios cinéticos de LC3-II y de tráfico intracelular en células infectadas con IAV y neumococo aportaran datos relevantes que ayudarán a entender el mecanismo sinérgico entre ambos patógenos. Por otra parte, luego de 3 h de infección, los niveles de LC3-II en células coinfectadas con la mutante *visH* no mostraron una disminución como se observó con la cepa salvaje (Fig. 17). El hecho de que estos niveles permanezcan elevados, sugiere que esta proteína participa en un mecanismo de evasión a la autofagia. En ausencia de IAV, VisH no afecta la sobrevivencia intracelular de neumococo (Fig. 14), por lo que solo es responsable del incremento de la sobrevivencia bacteriana en células infectadas con el virus. Estos resultados, demuestran que VisH desempeña un rol clave en el sinergismo entre *S. pneumoniae* e influenza A.

El estudio de la infección por *S. pneumoniae* a nivel celular ha permitido analizar diferentes aspectos de la relación huésped-patógeno desde una perspectiva bacteriana como también de la célula infectada. En relación a los mecanismos de patogénesis, este trabajo realiza un aporte para comprender el rol de los diferentes TCS bacterianos en respuesta al ambiente intracelular, la influencia de la acidificación dentro de los compartimentos endosomales y la coinfección con el virus influenza A. En relación a este último, la neumonía sigue siendo una causa importante de

morbilidad y mortalidad en todo el mundo, y tanto la gripe estacional como la pandémica pueden complicarse con neumonías bacterianas secundarias, causadas particularmente por neumococo. Nuestros resultados añaden una visión detallada de los mecanismos celulares y moleculares que favorecen la sobreinfección, reconociendo a la quinasa VisH como proteína clave en el sinergismo entre neumococo e IAV, y abriendo el camino hacia nuevas y más específicas posibilidades de intervención terapéutica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, condiciones de crecimiento y transformación:

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo se listan en **Anexo Tabla 2**. Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó medio Luria-Bertani (LB) líquido o sólido (Sambrook, 1989) 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 15% (concentración final, v/v) y se los guardó a -80 °C. Para los ensayos de detección de requerimientos nutricionales se utilizó el medio químicamente definido para neumococo (MDF), modificado de (Rijn and Kessler, 1980), cuya preparación consta del agregado de diferentes grupos de compuestos en el orden que se detalla en **Anexo Tabla 5**. La preparación original consta del agregado de vitaminas y cofactores; estos compuestos fueron reemplazados por la adición de RPMI vitamin solution-SIGMA[®], al 5%.

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares utilizadas fueron A549 (células epiteliales de carcinoma de pulmón, neumocitos tipo II), RAW264.7 (macrófagos murinos), MDCK.2 (células humanas tipo-epiteliales, túbulo distal de riñón). Estas han sido crecidas a 37 °C, 5% CO₂ en DMEM y 10% de Suero Fetal Bovino inactivado por calor) (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) o bien en OPTI-MEM I, para las condiciones de coinfección. Los cultivos completamente confluentes, crecidos en botellas de 75 cm² (Greiner Bio-one no. 658175), fueron repicados cada dos o tres días, utilizando tripsina/EDTA y diluyendo con medio fresco, hasta el octavo pasaje.

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*. Los stocks se crecieron en huevos de pollo de 9 días de embrionado, inyectado directamente en la cavidad alantoica. Después de 3 días de incubación a 37 °C, los huevos fueron perforados para recolectar el líquido alantoico. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 5000 rpm y se alícuotó el sobrenadante en fracciones de 500 µL, para guardar directamente a -80°C. Los stocks se semicuantificaron mediante la técnica de hemaglutinación.

Ensayos de hemaglutinación

Brevemente, 3 mL de sangre entera humana fue lavada 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 µL 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 (si existió hemaglutinación, observándose una delicada red, o una suspensión de glóbulos rojos).

Ensayos de placas de lisis

Para conocer el número de partículas infectivas en un stock viral se realizó una cuantificación por ensayo de placa, para el cual se plaquearon 1×10^6 células MDCK.2 por pocillo en una placa de 6 multipocillos. El medio de cultivo utilizado fue OPTI-MEM I sin SFB. Se realizaron diluciones seriadas del vial de virus a cuantificar, utilizando OPTI-MEM I + TPCK-tripsina ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$). Para infectar las células se adicionaron las diluciones virales e inmediatamente se llevó a heladera por 15 min. Luego, las células se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 45 min; esto fue necesario para permitir la endocitosis sincronizada en las células a infectar. Posteriormente se retiró el medio de infección y se adicionaron 2 mL de OPTI-MEM I + TPCK-Tripsina ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) + agarosa estéril (1% final) a cada pocillo; se incubó por 3-4 días a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Para poder realizar el recuento de placas de lisis se eliminó el medio de cobertura y se agregó solución de cristal violeta al 2%. Las células infectadas con el virus desarrollan lisis, dejando una marca en la monocapa de células, que no se colorea con el colorante cristal violeta. El número de partículas infectivas se obtuvo luego de contabilizar las placas de lisis en cada dilución y referirlas a la dilución inicial.

Tratamiento de las líneas celulares contra Micoplasma.

Las líneas celulares mencionadas anteriormente fueron descontaminadas de Micoplasma mediante un tratamiento con el antibiótico sparfloxacin (VETRANAL™, Fluka), $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ durante 7 días consecutivos en medio DMEM suplementado con SFB 20% (stock de antibiótico: $20 \text{ mg}/\text{mL}$, disuelto en solución $0,1 \text{ M}$ NaOH, filtrado y almacenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$). Luego del último día de tratamiento, las células fueron crecidas en medio sin antibiótico por dos pasajes más y posteriormente se congelaron primeramente a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ y luego en termo de Nitrógeno, resuspendidas en DMSO al 10% en SFB puro. Cada alícuota fue testeada por PCR antes y después del tratamiento, así como también después de ser descongeladas para trabajar.

Detección de contaminación por Micoplasma utilizando PCR

Extracción del DNA

El ADN de Micoplasma fue extraído por el método de fenol/cloroformo/isoamílico, modificado de van Kuppeveld (van Kuppeveld *et al.*, 1994). Brevemente, se tripsinizó una flask de 75 cm^2 con células eucariotas al 70-100% de confluencia, se centrifugó a 9000 rpm y el pellet se lavó 3 veces con PBS. Las células se resuspendieron en $200 \mu\text{L}$ de PBS y luego fueron calentadas a 95°C por 15 min. Se agregó Proteinasa K a una concentración final de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$. Se mezcló bien y se dejó incubar por al menos 1 h a $56 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente se inactivó la proteasa incubando la muestra a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Se agregó una cantidad de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló gentilmente para generar una emulsión. Se separó la fase orgánica de la acuosa por centrifugación a máxima velocidad durante 15 min a temperatura ambiente. Se extrajo una vez más con un volumen de cloroformo y se centrifugó nuevamente para recuperar la fase acuosa. Un volumen 1/10 de Acetato de Sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol frío fueron adicionados, para luego mezclar bien y permitir la precipitación del DNA. La mezcla se dejó reposar por al menos una hora. Se centrifugó a 12000 rpm por 20-30 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El sobrenadante fue descartado y el pellet se dejó secar en baño seco. El ADN fue resuspendido en $20 \mu\text{L}$ de agua destilada estéril.

Condiciones de la reacción de PCR

Los primers utilizados fueron MGSO/GPO3 y F_{GAPDH}/R_{GAPDH} (listados en **Anexo Tabla 4**). El primer par es específico para secuencias de ADN de *Mycoplasma*. El segundo par es específico para secuencias de DNA de células eucariotas y se utilizó como control interno de calidad de extracción de DNA y de reacción. La polimerasa empleada fue Taq, temperatura de annealing 65 °C y 30 ciclos de amplificación. La longitud de los fragmentos obtenidos fue: 270 pb para las muestras positivas hacia *Mycoplasma*, y de 410 pb para los controles internos de GAPDH. Las muestras de PCR fueron visualizadas en geles de agarosa 2% (35 min a 70 mV), corridas en buffer TAE 1X, y teñidas con SYBrSAFE (Invitrogen).

Ensayos de infección por neumococo

Cuantificación de la sobrevivida intracelular

El número de neumococo intracelular viable recuperado luego de la endocitosis o fagocitosis fue cuantificado mediante una adaptación del ensayo de protección de antibióticos. Brevemente, se sembraron 3.2×10^5 células A549 o bien 4.2×10^5 células RAW 264.7 por pocillo, en una placa de 6 multipocillos (Greiner Bio-One657160), y se incubaron por 12 hs en medio DMEM suplementado con 20% de SFB. Neumococo fue crecido en medio BHI hasta $DO_{600nm} \approx 0,3$ y luego se resuspendió en medio DMEM con 20% SFB. La infección de las monocapas celulares fue llevada a cabo utilizando una multiplicidad de infección (MOI) 20. El tiempo de incubación fue dependiente de la línea celular infectada, siendo de 3 h para A549 y 1 h para RAW264.7. Luego de este período, las células fueron lavadas con PBS y se agregó DMEM fresco, sin SFB, conteniendo 200 µg/mL de penicilina G (Sigma, #P7794) y 900 µg/mL de sulfato de gentamicina (US Biological, #G2030). Después de 20 min, las células fueron lavadas tres veces con PBS, lisadas por centrifugación a 10000 rpm por 5 min y el pellet (bacterias intracelulares liberadas y debris de células eucariotas) se resuspendió en 100µL de medio BHI. Se cuantificó el número de bacterias intracelulares sobrevivientes en diferentes tiempos, a través de diluciones seriadas y de plaqueo de 50µL sobre placas de BHI-agar suplementadas con 5% sangre de carnero. Estas últimas se incubaron por 16 h a 37 °C. La escala de tiempo utilizada en estos ensayos refiere al tiempo luego de la eliminación de las bacterias extracelulares por el tratamiento con antibióticos que no penetran las membranas celulares. El 100% de sobrevivida se dispuso como la cantidad de bacteria internalizada inmediatamente luego de los 20 min de incubación con antibióticos. Todas las muestras fueron referidas a ese punto para el cálculo de los respectivos porcentajes.

Ensayos de inhibición de la acidificación lisosomal

Cuantificación de la sobrevivida intracelular

Los ensayos de invasión en presencia de bafilomicina A1 (BafA1) o Cloroquina (Chq) fueron realizados tal como se describió previamente el ensayo de protección con antibióticos con algunas modificaciones. Las células A549 o RAW264.7 fueron crecidas en placas de 6 multipocillos. Los cultivos de neumococo se prepararon como se describió anteriormente, hasta llegar a $DO_{600nm} \approx 0,3$ y se realizaron diluciones hasta obtener la cantidad de bacterias necesarias para alcanzar una MOI 20. Las células eucariotas fueron incubadas con las bacterias durante 180 min. Posteriormente las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y se agregó medio fresco conteniendo antibióticos

(gentamicina y penicilina) junto con BafA1 (100nM), Chq (12,5 μ M) o DMEM (control), según corresponda. Las células se mantuvieron al abrigo de luz hasta el tiempo correspondiente, cuando fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y lisadas para plaquear como se describió anteriormente.

Citometría de flujo

La redistribución de la fosfatidilserina (FS) en la membrana plasmática es un marcador de la apoptosis temprana. La marcación con anexina-V precede a la pérdida de integridad en la membrana, hecho que acompaña los estadios tardíos de la muerte celular como resultado de procesos apoptóticos o necróticos. La marcación de Anexina-V se utiliza comúnmente en conjunto con la sonda vital 7-amino-actinomicina (7AAD), para permitir identificar las células muertas, ya sea por un proceso necrótico o apoptótico tardío. Apoptosis y necrosis fueron evaluadas mediante la unión de anexina-V con ficoeritrina (PE) y 7AAD (PerCP) (BD Biosciences) siguiendo el protocolo del fabricante. Un día antes del ensayo se sembraron 3.2×10^5 células A549 por pocillo, en placas de 6 multipocillos. Al siguiente día, neumococo (*R801*) crecido en medio BHI hasta $DO_{600nm} \approx 0,3$, fue incubado durante 180 min en contacto con las monocapas celulares, utilizando MOI 20 en medio DMEM + SFB20%. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, y se eliminaron las bacterias extracelulares mediante el uso de antibióticos. Concomitantemente se adicionaron los inhibidores de la acidificación: BafA1 (100nM), Chq (12,5 μ M), comparados con la condición control (solamente antibióticos), los que fueron incubados durante 20, 60 y 180 min. Concomitantemente se realizaron controles en células que no recibieron ningún tratamiento (sin inhibidores/sin bacteria). En los tiempos correspondientes, las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS frío y se tripsinizaron suavemente (Tripsina/EDTA 0,5X). Se realizó una centrifugación a 1200 rpm a 4 °C, durante 7 min. En cada muestra, el pellet se resuspendió en 100 μ L de Binding Buffer (BB) + Annexina V (2 μ L), y se incubó al abrigo de la luz durante 15 min, a temperatura ambiente. Se adicionaron 400 μ L de BB para lavar y nuevamente se centrifugó a 1200 rpm a 4 °C, por 7 min. La resuspensión se realizó en 100 μ L de BB + 4 μ L de 7AAD, por tubo. Las muestras se mantuvieron en la oscuridad y se incubaron durante 15 min previos al análisis por citometría de flujo en un citómetro de FACSCantoll (BD Biosciences) utilizando software FACSDiva BD (BD Biosciences). Un total de 50000 células fueron contadas para cada situación.

Ensayos de coinfección

Cuantificación de la sobrevida intracelular

El número de neumococo intracelular viable dentro de células infectadas con influenza fue cuantificado mediante una adaptación del ensayo de protección de antibióticos. Se sembraron 3.2×10^5 células A549 por pocillo, en una placa de 6 multipocillos (Greiner Bio-One657160), utilizando medio OPTI-MEM I suplementado con 5% de SFB. Al siguiente día, las monocapas fueron lavadas con PBS y luego infectadas con la dilución indicada PR8 a fin de obtener una MOI 1, utilizando OPTI MEM I + TPCK-Tripsina (1 μ g/mL); la incubación fue en heladera (4 °C) durante 15 min, y a 37 °C por otros 45 min. Luego de este tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y se agregó medio fresco (OPTI-MEM I + TPCK-Tripsina) continuando la incubación a 37 °C durante 1h. Posteriormente, las células A549 fueron infectadas durante 180 min con neumococo crecido previamente en BHI hasta alcanzar una $DO_{600nm} \approx 0,3$; la MOI de infección fue de 20. Luego de este período, las células

fueron lavadas con PBS y se agregó OPTI-MEM I fresco, sin SFB, conteniendo 200 µg/mL de penicilina G (Sigma, #P7794) y 900 µg/mL de sulfato de gentamicina (US Biological, #G2030). Después de 20 min, las células fueron lavadas tres veces con PBS, lisadas por centrifugación a 10000 rpm por 5 min y el pellet (bacterias intracelulares liberadas y debris de células eucariotas) se resuspendió en 100µL de medio BHI. Se cuantificó el número de bacterias intracelulares sobrevivientes en diferentes tiempos, a través de diluciones seriadas y de plaqueo de 50µL sobre placas de BHI-agar suplementadas con 5% sangre de carnero. Estas últimas se incubaron por 16 h a 37 °C. La escala de tiempo utilizada en estos ensayos refiere al tiempo luego de la eliminación de las bacterias extracelulares, mediante el tratamiento con antibióticos que no penetren las membranas celulares. El 100% de sobrevivida se dispuso como la cantidad de bacteria internalizada inmediatamente luego de los 20 min de incubación con antibióticos. Todas las muestras fueron referidas a ese punto para el cálculo de los respectivos porcentajes.

Análisis estadístico

Los datos presentados en las figuras están expresados como media ± desviación estándar (DS), representando al menos tres experimentos independientes. Donde se indica, las diferencias significativas fueron probadas mediante los test estadísticos ANOVA de una o dos vías según corresponda el caso, utilizando el programa de análisis estadístico GraphPad Prism Versión 5.01 (GraphPad Software). Los test a posteriori se indican particularmente en cada figura. Se consideró diferencia significativa $P < 0,05$.

Construcción de mutantes

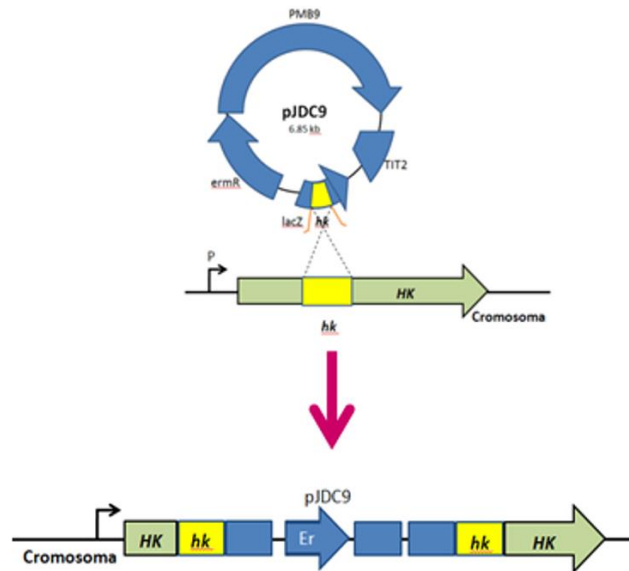
Aislamiento y purificación de plásmidos

La extracción de pequeñas cantidades de ADN plasmídico a partir de *E. coli* se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina (Sambrook et al, 1989). La cepa TOP10 (Invitrogen, USA) conteniendo alguno de los plásmidos de interés se cultivó durante 16 hs con agitación a 37 °C en 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico apropiado: ampicilina (100 µg/mL), eritromicina (400 µg/mL). Se recogieron las células por centrifugación durante 2 min a 16000 g y el pellet bacteriano se resuspendió en 200 µL de solución I (Glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM, pH 8). Se agregaron luego 400 µL de solución II (SDS 1%; NaOH 0,2 N), se incubó en hielo 10 min, se adicionaron 350 µL de solución III (Acetato 3 M; K^+ 5 M) y se volvió a incubar 10 min en hielo. Se centrifugó 10 min. A 16000 g y el sobrenadante obtenido fue precipitado con 0,6 volúmenes de isopropanol durante 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 min a 16000 g y se colocó el eppendorf en un baño seco a 65 °C por al menos 15 min. El pellet se resuspendió en 50µL de TE 1X con RNAsa 1mg/mL y se lo incubó al menos 1 h a 37 °C. El rendimiento del plásmido se estimó visualmente a partir de geles de agarosa al 1%, corridos en buffer TAE 1X y teñidos con bromuro de etidio.

Mutagénesis por inserción-duplicación

El listado de los plásmidos usados en este estudio se muestra en **Anexo Tabla 3**, y el listado de primers en **Anexo Tabla 4**. Las mutantes *hk01*, *hk03*, *hk04*, *hk06*, *hk07*, *hk08*, *hk09*, *hk10*, *hk11*, *hk13* y *rr14* se obtuvieron empleando mutagénesis por inserción-duplicación (Morrison, 1984; Lee

1998). Para construir la cepa R801 *hk01*, se amplificó un fragmento interno del gen *hk01* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers F_{hk01} y R_{hk01} , y se lo clonó en pCR2.1TOPO (Invitrogen, USA) para dar el plásmido pCRhk01. El fragmento liberado de la digestión de pCRhk01 con las enzimas de restricción BamHI y XHO se ligó al plásmido no replicativo pJDC9 (Chen *et al.*, 1988) digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante pJDC9hk01 se usó para transformar la cepa R801. Las transformantes se seleccionaron en placas de BHI agar sangre de carnero 5%, conteniendo eritromicina 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La presencia de la mutación se confirmó por PCR utilizando los primers F_{HK01} y $R_{ery-chq}$.



Esquema 13. Mecanismo de Inserción-Duplicación empleado para la obtención de las mutantes en los Sistemas de Dos Componentes de neumococo.

Transformación de *S. pneumoniae*

Los ensayos de transformación se realizaron según el protocolo de Echenique et al (2000). Las células pre-competentes se prepararon a partir de cultivos crecidos en medio CAT pH 6,8 (Morrison et al, 1983) hasta $\text{DO}_{600\text{nm}} \approx 0,1$, las cuales fueron centrifugadas por 2 minutos a 15000g, resuspendidas en medio CTM pH 7,8 conteniendo glicerol al 15% y guardados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las células precompetentes se descongelaron en hielo, se centrifugaron a 5000 g por 5 minutos y se resuspendieron en medio CTM pH 7,8 fresco. Posteriormente, se adicionó CSP (500 ng/mL), se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos y se agregó el ADN: 1 μg de ADN genómico ó 100-150 ng de ADN plasmídico (o de fragmentos de PCR). Las células se incubaron durante 30 minutos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir la captación de ADN, y se diluyeron 1/10 con CTM pH 7,8. Se incubó durante 2 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir la segregación del cromosoma y la expresión fenotípica. Las transformantes se seleccionaron plaqueando las células en medio BHI agar-sangre de carnero al 5% suplementado con el antibiótico apropiado y cultivando durante 16-24 hs a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Crecimiento en Medio Químicamente Definido (MDF)

Las curvas de crecimiento de neumococo en medio MDF se obtuvieron de la siguiente manera. Los stocks de trabajo, previamente guardados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron descongelados y

centrifugados a 7000 rpm; el pellet se resuspendió en medio BHI y se incubó a 37 °C. Una vez alcanzada una $DO_{600nm} \approx 0,3$, las bacterias fueron centrifugadas a 7000 rpm y el pellet se resuspendió en medio MDF hasta obtener una $DO_{600nm} \approx 0,1$. Los cultivos fueron a crecidos a 37 °C, y la DO_{600nm} se controló cada media hora mediante un espectrofotómetro

Electroforesis e inmunodetección de proteínas

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Potran BA 83, Whatman) (Towbin *et al.*, 1979). Las membranas fueron bloqueadas durante una hora a temperatura ambiente en PBS suplementado con 5% de leche descremada. Luego, las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en un agitador giratorio con los anticuerpos primarios para detectar LC3 (anti-LC3, Cell Signalling 4108, dilución 1:1000), y β -actin (anti- β -actina, monoclonal de ratón, dilución 1:20000, Sigma-Aldrich). Posteriormente las membranas fueron lavadas e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios: Anticuerpo InfraRedDye-680 anti-ratón hecho en cabra (1:25000, LI-COR Biosciences), y anticuerpo IRD-800 anti-conejo hecho en cabra (1:15000, LI-COR Biosciences). Las proteínas inmunodetectadas fueron visualizadas empleando el sistema de imagen Odyssey IR (LI-COR Biosciences) .

ANEXOS

Tabla 2. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Denominación	Características relevantes	Referencia	
<i>S. pneumoniae</i>				
R801	R801	Cepa salvaje, acapsulada, derivada de ATCC BAA-255, <i>hexB</i>	Lefevre, 1979	
D39 NCTC 7466	D39	Cepa capsulada virulenta, serotipo 2	Morrison, 1983	
	HK01, VisH	R801 <i>hk01::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio	
	HK02, MicB	R801 <i>micB::pPT12</i> , Kan ^R	Echenique, 2001; Piñas, 2008	
	HK03	R801 <i>hk03::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio	
	HK04	R801 <i>hk04::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio	
	RC870	RR05, CiaR	R801 <i>ciaR::pAM239</i> , Spc ^R	Piñas, 2008
	RC880	HK05, CiaH	R801 <i>ciaH::pAM239</i> , Spc ^R	Piñas, 2008
		HK06	R801 <i>hk06::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio
		HK07	R801 <i>hk07::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio
		HK08	R801 <i>hk08::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio
		HK09	R801 <i>hk09::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio
HK10		R801 <i>hk10::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio	
HK11		R801 <i>hk11::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio	
RC830		HK12, ComE	R801 <i>comE::aphA3</i> , Kan ^R	Piñas, 2008
	HK13	R801 <i>hk13::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio	
	RR14, RitR	R801 <i>rr14::pJDC9</i> , Er ^R	Este estudio	
RC820	LytA	R801 <i>lytA::Pva891</i> , Er ^R	Piñas, 2008	
R873	CiaR, ComE	RC870 <i>comE::aphA3^A</i> , Spc ^R , Kan ^R	Piñas, 2008	
RC883	CiaH, ComE	RC880 <i>comE::aphA3^A</i> , Spc ^R , Kan ^R	Piñas, 2008	
<i>E. coli</i>				
TOP10	TOP10	<i>F mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu) 7697 galU galk rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen, USA	

Er, eritromicina; Kan, kanamicina; Spc, espectinomycinina; ^R, resistente.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pCR2.1 TOPO	Vector de clonado, selección lacZα, Amp ^R , Kan ^R .	Invitrogen, USA
pJDC9	Vector shuttle, de inserción-duplicación, selección lacZα, Er ^R .	Morrison, 1987

Amp, Ampicilina; Er, eritromicina; Kan, kanamicina; ^R, resistente.

Tabla 4. Primers utilizados en este estudio.

Primer	Secuencia
F_{hk01}	5' -TTCTTTGGCATTCTTGTCTTACTC-3'
kR_{hk01}	5' -TGATGGACCCACAAGGTATAGTAAT-3'
F_{hk03}	5' -TGCTCTCACCTCCTTCTGT-3'
R_{hk03}	5' -CGCAAACAACCTCCTGACTGA-3'
F_{hk04}	5' -ATGGCATTAACTTGGATCAGTAAAG-3'
R_{hk04}	5' -CGACTGGATAATAACATCTGACCTT-3'
F_{hk06}	5' -CAATCTAGGTGGTGTGGTCTAGT-3'
R_{hk06}	5' -TGTACCTGTTTACCATCTGCTGTA-3'
F_{hk07}	5' -GAGCTTAGTCAAAAAGATGCCAATA-3'
R_{hk07}	5' -AGGCAATGGACTTGGGATAG-3'
F_{hk08}	5' -TTCAACCCTCTTAACCATTTTG-3'
R_{hk08}	5' -GGGTCTTAATATCATGCGACAAC-3'
F_{hk09}	5' -AAACGACCATCAGCCAGACT-3'

R_{hk09}	5' -TATCCAAACGAAGCACACCA-3'
F_{hk10}	5' -TCATCGTCAGGAAACCATTTG-3'
R_{hk10}	5' -CCACCAAGAGGGAAATCAGA-3'
F_{hk11}	5' -GTGGCGTATTTGGGTGTTTT-3'
R_{hk11}	5' -CGTTCATTTTCAGCAAGCAA-3'
F_{hk13}	5' -TGGAAATTGGTCTCACTTTCG-3'
R_{hk13}	5' -CCCATGCCCAGTTAATCTT-3'
F_{rr14}	5' -ACTTGAGAAAGAACGAAATCTAGCTCA-3'
R_{rr14}	5' -TTCGATAAGGACTGGCTTATAGATG-3'
R_{ery-chk}	5' - -3'
F_{MGSO}	5' -CCRTGCACCAYCTGTCWHHHBGWWAACCTC-3'
R_{GP03}	5' -GAAAGYGTGGGGAGCAAAYAGGATTAGATACCCT-3'
F_{GAPDH}	5' -CACTGCCACCCAGAAGACTGTGGAT-3'
R_{GAPDH}	5' -CAGGAAATGAGCTTGACAAAGTGGTC-3'

Tabla 5. Medio químicamente definido para neumococo (MDF). (Modificado de (van de Rijn *et al.*, 1980)

Grupo	Componente	Concentración final (µg/mL)
1	FeSO ₄ · 7H ₂ O	5
	K ₂ HPO ₄	200
	KH ₂ PO ₄	1000
	MgSO ₄	700
	MnSO ₄	5
2	DL-Arginina	100
	L-Cistina	50
	Glicina	100
	L-Histidina	100
	L-Isoleucina	100
	L-Leucina	100
	L-Metionina	100
	L-Valina	100
	L-Alanina	100
	L-Glutamina	200
	L-Ác. Aspártico	100
	L- Ác. Glutámico	100
	L-Lisina	100
	L-Fenilalanina	100
	L- Prolina	100
	Hidroxi-L-Prolina	100
	L-Serina	100
L-Treonina	200	
L-Triptofano	100	
L-Tirosina	100	
3	RPMI Vitamin Solution*	5%
4	Glucosa	10000
5	CaCl ₂	10
	NaCH ₃ COO	4500
	L-Cisteína	500
	NaHCO ₃	2500
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3195
6	Na ₂ HPO ₄	7350
	H ₂ O	c.s.p. 100mL

* El agregado de la solución comercial "RPMI vitamin Solution" sustituye la adición individual de: Ácido p-Aminobenzóico, Biotina, Ácido Fólico, Niacinamida, β-Nicotinamida Adenina Dinucleótido, Pantotenato de Calcio, Pyridoxal, Dihidrocloreuro de Pyridoxamina, Riboflavina, Cloruro de Tiamina, Vitamina B₁₂ y Colina.

REFERENCIAS

- Abramson, J. S., Giebink, G. S., Mills, E. L., and Quie, P. G. (1981).** "Polymorphonuclear Leukocyte Dysfunction During Influenza Virus Infection in Chinchillas." *J Infect Dis* **143**, no. 6, 836-45.
- Agarwal, S., Agarwal, S., Pancholi, P., and Pancholi, V. (2012).** "Strain-Specific Regulatory Role of Eukaryote-Like Serine/Threonine Phosphatase in Pneumococcal Adherence." *Infect Immun* **80**, no. 4, 1361-72.
- Agarwal, V., Asmat, T. M., Dierdorf, N. I., Hauck, C. R., and Hammerschmidt, S. (2010).** "Polymeric Immunoglobulin Receptor-Mediated Invasion of Streptococcus Pneumoniae into Host Cells Requires a Coordinate Signaling of Src Family of Protein-Tyrosine Kinases, Erk, and C-Jun N-Terminal Kinase." *J Biol Chem* **285**, no. 46, 35615-23.
- Agola, J. O., Jim, P. A., Ward, H. H., Basuray, S., and Wandinger-Ness, A. (2011).** "Rab Gtpases as Regulators of Endocytosis, Targets of Disease and Therapeutic Opportunities." *Clin Genet* **80**, no. 4, 305-18.
- Ali, Y. M., Kenawy, H. I., Muhammad, A., Sim, R. B., Andrew, P. W., and Schwaeble, W. J. (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**, no. 12, e82583.
- Alsharifi, M., Lobigs, M., Regner, M., Lee, E., Koskinen, A., and Mullbacher, A. (2005).** "Type I Interferons Trigger Systemic, Partial Lymphocyte Activation in Response to Viral Infection." *J Immunol* **175**, no. 7, 4635-40.
- Anderson, R., and Smith, B. (2005).** "Deaths: Leading Causes for 2002." *Natl. Vital Stat. Rep* **53**, 1-89.
- Anderson, R. N., and Smith, B. L. (2005).** "Deaths: Leading Causes for 2002." *Natl Vital Stat Rep* **53**, no. 17, 1-89.
- Anderton, J. M., Rajam, G., Romero-Steiner, S., Summer, S., Kowalczyk, A. P., Carlone, G. M., Sampson, J. S., and Ades, E. W. (2007).** "E-Cadherin Is a Receptor for the Common Protein Pneumococcal Surface Adhesin a (PsaA) of Streptococcus Pneumoniae." *Microb Pathog* **42**, no. 5-6, 225-36.
- Asmat, T. M., Agarwal, V., Saleh, M., and Hammerschmidt, S. (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**, no. 8, 1233-46.
- Attali, C., Durmort, C., Vernet, T., and Di Guilmi, A. M. (2008).** "The Interaction of Streptococcus Pneumoniae with Plasmin Mediates Transmigration across Endothelial and Epithelial Monolayers by Intercellular Junction Cleavage." *Infect Immun* **76**, no. 11, 5350-6.
- Austrian, R. (1986).** "Some Aspects of the Pneumococcal Carrier State." *J Antimicrob Chemother* **18 Suppl A**, 35-45.
- Avadhanula, V., Rodriguez, C. A., Devincenzo, J. P., Wang, Y., Webby, R. J., Ulett, G. C., and Adderson, E. E. (2006).** "Respiratory Viruses Augment the Adhesion of Bacterial Pathogens to Respiratory Epithelium in a Viral Species- and Cell Type-Dependent Manner." *J Virol* **80**, no. 4, 1629-36.
- Bai, X. H., Chen, H. J., Jiang, Y. L., Wen, Z., Huang, Y., Cheng, W., Li, Q., et al. (2014).** "Structure of Pneumococcal Peptidoglycan Hydrolase LytB Reveals Insights into the Bacterial Cell Wall Remodeling and Pathogenesis." *J Biol Chem* **289**, no. 34, 23403-16.
- Balachandran, P., Hollingshead, S. K., Paton, J. C., and Briles, D. E. (2001).** "The Autolytic Enzyme LytA of Streptococcus Pneumoniae Is Not Responsible for Releasing Pneumolysin." *J Bacteriol* **183**, no. 10, 3108-16.

- Barrile, R., Kasendra, M., Rossi-Paccani, S., Merola, M., Pizza, M., Baldari, C., Soriani, M., and Arico, B. (2015).** "Neisseria Meningitidis Subverts the Polarized Organization and Intracellular Trafficking of Host Cells to Cross the Epithelial Barrier." *Cell Microbiol.*
- Barth, H., Blocker, D., Behlke, J., Bergsma-Schutter, W., Brisson, A., Benz, R., and Aktories, K. (2000).** "Cellular Uptake of Clostridium Botulinum C2 Toxin Requires Oligomerization and Acidification." *J Biol Chem* **275**, no. 25, 18704-11.
- Bartilson, M., Marra, A., Christine, J., Asundi, J. S., Schneider, W. P., and Hromockyj, A. E. (2001).** "Differential Fluorescence Induction Reveals Streptococcus Pneumoniae Loci Regulated by Competence Stimulatory Peptide." *Mol Microbiol* **39**, no. 1, 126-35.
- Bartlett, J. A., Fischer, A. J., and McCray, P. B., Jr. (2008).** "Innate Immune Functions of the Airway Epithelium." *Contrib Microbiol* **15**, 147-63.
- Beale, R., Wise, H., Stuart, A., Ravenhill, B. J., Digard, P., and Randow, F. (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**, no. 2, 239-47.
- Bean, B., and Tomasz, A. (1977).** "Choline Metabolism in Pneumococci." *J Bacteriol* **130**, no. 1, 571-4.
- Bearson, B. L., Wilson, L., and Foster, J. W. (1998).** "A Low Ph-Inducible, Phopq-Dependent Acid Tolerance Response Protects Salmonella Typhimurium against Inorganic Acid Stress." *J Bacteriol* **180**, no. 9, 2409-17.
- Beeler, E. (2009).** "Influenza in Dogs and Cats." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **39**, no. 2, 251-64.
- Bender, M. H., and Yother, J. (2001).** "CpsB Is a Modulator of Capsule-Associated Tyrosine Kinase Activity in Streptococcus Pneumoniae." *J Biol Chem* **276**, no. 51, 47966-74.
- Benton, K. A., Paton, J. C., and Briles, D. E. (1997).** "The Hemolytic and Complement-Activating Properties of Pneumolysin Do Not Contribute Individually to Virulence in a Pneumococcal Bacteremia Model." *Microb Pathog* **23**, no. 4, 201-9.
- Bergmann, S., and Hammerschmidt, S. (2006).** "Versatility of Pneumococcal Surface Proteins." *Microbiology* **152**, no. Pt 2, 295-303.
- Bermudez, L. E., Wu, M., Miltner, E., and Inderlied, C. B. (1999).** "Isolation of Two Subpopulations of Mycobacterium Avium within Human Macrophages." *FEMS Microbiol Lett* **178**, no. 1, 19-26.
- Berry, A. M., and Paton, J. C. (2000).** "Additive Attenuation of Virulence of Streptococcus Pneumoniae by Mutation of the Genes Encoding Pneumolysin and Other Putative Pneumococcal Virulence Proteins." *Infect Immun* **68**, no. 1, 133-40.
- Bewley, M. A., Marriott, H. M., Tulone, C., Francis, S. E., Mitchell, T. J., Read, R. C., Chain, B., et al. (2011).** "A Cardinal Role for Cathepsin D in Co-Ordinating the Host-Mediated Apoptosis of Macrophages and Killing of Pneumococci." *PLoS Pathog* **7**, no. 1, e1001262.
- Bewley, M. A., Naughton, M., Preston, J., Mitchell, A., Holmes, A., Marriott, H. M., Read, R. C., et al. (2014).** "Pneumolysin Activates Macrophage Lysosomal Membrane Permeabilization and Executes Apoptosis by Distinct Mechanisms without Membrane Pore Formation." *MBio* **5**, no. 5, e01710-14.
- Birmingham, C. L., and Brumell, J. H. (2006).** "Autophagy Recognizes Intracellular Salmonella Enterica Serovar Typhimurium in Damaged Vacuoles." *Autophagy* **2**, no. 3, 156-8.
- Birmingham, C. L., Higgins, D. E., and Brumell, J. H. (2008).** "Avoiding Death by Autophagy: Interactions of Listeria Monocytogenes with the Macrophage Autophagy System." *Autophagy* **4**, no. 3, 368-71.
- Birmingham, C. L., Smith, A. C., Bakowski, M. A., Yoshimori, T., and Brumell, J. H. (2006).** "Autophagy Controls Salmonella Infection in Response to Damage to the Salmonella-Containing Vacuole." *J Biol Chem* **281**, no. 16, 11374-83.
- Bitsaktsis, C., Iglesias, B. V., Li, Y., Colino, J., Snapper, C. M., Hollingshead, S. K., Pham, G., Gosselin, D. R., and Gosselin, E. J. (2012).** "Mucosal Immunization with an Unadjuvanted

- Vaccine That Targets Streptococcus Pneumoniae Pspa to Human Fcγ Receptor Type I Protects against Pneumococcal Infection through Complement- and Lactoferrin-Mediated Bactericidal Activity." *Infect Immun* **80**, no. 3, 1166-80.
- Blevins, L. K., Wren, J. T., Holbrook, B. C., Hayward, S. L., Swords, W. E., Parks, G. D., and Alexander-Miller, M. A. (2014).** "Coinfection with Streptococcus Pneumoniae Negatively Modulates the Size and Composition of the Ongoing Influenza-Specific Cd8(+) T Cell Response." *J Immunol* **193**, no. 10, 5076-87.
- Blue, C. E., and Mitchell, T. J. (2003).** "Contribution of a Response Regulator to the Virulence of Streptococcus Pneumoniae Is Strain Dependent." *Infect Immun* **71**, no. 8, 4405-13.
- Bogaert, D., De Groot, R., and Hermans, P. W. (2004).** "Streptococcus Pneumoniae Colonisation: The Key to Pneumococcal Disease." *Lancet Infect Dis* **4**, no. 3, 144-54.
- Bouloy, M., Morgan, M. A., Shatkin, A. J., and Krug, R. M. (1979).** "Cap and Internal Nucleotides of Reovirus Mrna Primers Are Incorporated into Influenza Viral Complementary Rna During Transcription in Vitro." *J Virol* **32**, no. 3, 895-904.
- Brittan, J. L., Buckeridge, T. J., Finn, A., Kadioglu, A., and Jenkinson, H. F. (2012).** "Pneumococcal Neuraminidase A: An Essential Upper Airway Colonization Factor for Streptococcus Pneumoniae." *Mol Oral Microbiol* **27**, no. 4, 270-83.
- Brock, S. C., McGraw, P. A., Wright, P. F., and Crowe, J. E., Jr. (2002).** "The Human Polymeric Immunoglobulin Receptor Facilitates Invasion of Epithelial Cells by Streptococcus Pneumoniae in a Strain-Specific and Cell Type-Specific Manner." *Infect Immun* **70**, no. 9, 5091-5.
- Brown, J. S., Ogunniyi, A. D., Woodrow, M. C., Holden, D. W., and Paton, J. C. (2001).** "Immunization with Components of Two Iron Uptake ABC Transporters Protects Mice against Systemic Streptococcus Pneumoniae Infection." *Infect Immun* **69**, no. 11, 6702-6.
- Buchacher, T., Wiesinger-Mayr, H., Vierlinger, K., Ruger, B. M., Stanek, G., Fischer, M. B., and Weber, V. (2014).** "Human Blood Monocytes Support Persistence, but Not Replication of the Intracellular Pathogen C. Pneumoniae." *BMC Immunol* **15**, no. 1, 60.
- Campoy, E., and Colombo, M. I. (2009).** "Autophagy in Intracellular Bacterial Infection." *Biochim Biophys Acta* **1793**, no. 9, 1465-77.
- Campoy, E., and Colombo, M. I. (2009).** "Autophagy Subversion by Bacteria." *Curr Top Microbiol Immunol* **335**, 227-50.
- Cao, J., Wang, D., Xu, F., Gong, Y., Wang, H., Song, Z., Li, D., et al. (2014).** "Activation of IL-27 Signalling Promotes Development of Postinfluenza Pneumococcal Pneumonia." *EMBO Mol Med* **6**, no. 1, 120-40.
- Cao, Y., and Klionsky, D. J. (2007).** "Physiological Functions of Atg6/Beclin 1: A Unique Autophagy-Related Protein." *Cell Res* **17**, no. 10, 839-49.
- Cartwright, K. (2002).** "Pneumococcal Disease in Western Europe: Burden of Disease, Antibiotic Resistance and Management." *Eur J Pediatr* **161**, no. 4, 188-95.
- Celli, J., and Finlay, B. B. (2002).** "Bacterial Avoidance of Phagocytosis." *Trends Microbiol* **10**, no. 5, 232-7.
- Cemma, M., and Brumell, J. H. (2012).** "Interactions of Pathogenic Bacteria with Autophagy Systems." *Curr Biol* **22**, no. 13, R540-5.
- Centers for Disease, C., and Prevention. (2009).** "Bacterial Coinfections in Lung Tissue Specimens from Fatal Cases of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **58**, no. 38, 1071-4.
- Cian, M. B., Cortes, P. R., Pinas, G. E., Yandar, N., and Echenique, J. (2015).** "Stress-Triggered Signaling Affecting Survival or Suicide of Streptococcus Pneumoniae." *Int J Med Microbiol* **305**, no. 1, 157-69.
- Claverys, J. P., and Havarstein, L. S. (2002).** "Extracellular-Peptide Control of Competence for Genetic Transformation in Streptococcus Pneumoniae." *Front Biosci* **7**, d1798-814.

- Claverys, J. P., Martin, B., and Polard, P. (2009).** "The Genetic Transformation Machinery: Composition, Localization, and Mechanism." *FEMS Microbiol Rev* **33**, no. 3, 643-56.
- Claverys, J. P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006).** "Induction of Competence Regulons as a General Response to Stress in Gram-Positive Bacteria." *Annu Rev Microbiol* **60**, 451-75.
- Cockeran, R., Herbert, J. A., Mitchell, T. J., Dix-Peek, T., Dickens, C., Anderson, R., and Feldman, C. (2014).** "Exposure of a 23f Serotype Strain of *Streptococcus Pneumoniae* to Cigarette Smoke Condensate Is Associated with Selective Upregulation of Genes Encoding the Two-Component Regulatory System 11 (Tcs11)." *Biomed Res Int* **2014**, 976347.
- Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003).** "Regulated Portals of Entry into the Cell." *Nature* **422**, no. 6927, 37-44.
- Cortes, T. D. P.** "Caracterización Del Mecanismo De Adaptación Al Estrés Ácido De *Streptococcus Pneumoniae*: Contribución De Sistemas De Transducción De Señales, De Proteasas Específicas Y De La Enzima Fof₁-H⁺-Atpasa." Universidad Nacional de Córdoba, 2013.
- Cossart, P. (2004).** "Bacterial Invasion: A New Strategy to Dominate Cytoskeleton Plasticity." *Dev Cell* **6**, no. 3, 314-5.
- Cossart, P., and Helenius, A. (2014).** "Endocytosis of Viruses and Bacteria." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, no. 8.
- Cossart, P., and Roy, C. R. (2010).** "Manipulation of Host Membrane Machinery by Bacterial Pathogens." *Curr Opin Cell Biol* **22**, no. 4, 547-54.
- Cossart, P., and Veiga, E. (2008).** "Non-Classical Use of Clathrin During Bacterial Infections." *J Microsc* **231**, no. 3, 524-8.
- Cotter, P. D., and Hill, C. (2003).** "Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low Ph." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, no. 3, 429-53, table of contents.
- Coutanceau, E., Marsollier, L., Brosch, R., Perret, E., Goossens, P., Tanguy, M., Cole, S. T., Small, P. L., and Demangel, C. (2005).** "Modulation of the Host Immune Response by a Transient Intracellular Stage of *Mycobacterium Ulcerans*: The Contribution of Endogenous Mycolactone Toxin." *Cell Microbiol* **7**, no. 8, 1187-96.
- Cundell, D. R., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., Tuomanen, E. I., and Gerard, N. P. (1996).** "Paf Receptor Anchors *Streptococcus Pneumoniae* to Activated Human Endothelial Cells." *Adv Exp Med Biol* **416**, 89-94.
- Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., and Tuomanen, E. I. (1995).** "*Streptococcus Pneumoniae* Anchor to Activated Human Cells by the Receptor for Platelet-Activating Factor." *Nature* **377**, no. 6548, 435-8.
- Cundell, D. R., Weiser, J. N., Shen, J., Young, A., and Tuomanen, E. I. (1995).** "Relationship between Colonial Morphology and Adherence of *Streptococcus Pneumoniae*." *Infect Immun* **63**, no. 3, 757-61.
- Chao, Y., Marks, L. R., Pettigrew, M. M., and Hakansson, A. P. (2014).** "*Streptococcus Pneumoniae* Biofilm Formation and Dispersion During Colonization and Disease." *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 194.
- Chen, J. D., and Morrison, D. A. (1988).** "Construction and Properties of a New Insertion Vector, Pjdc9, That Is Protected by Transcriptional Terminators and Useful for Cloning of DNA from *Streptococcus Pneumoniae*." *Gene* **64**, no. 1, 155-64.
- Chen, R., and Holmes, E. C. (2006).** "Avian Influenza Virus Exhibits Rapid Evolutionary Dynamics." *Mol Biol Evol* **23**, no. 12, 2336-41.
- Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., et al. (2001).** "A Novel Influenza A Virus Mitochondrial Protein That Induces Cell Death." *Nat Med* **7**, no. 12, 1306-12.
- Chertow, D. S., and Memoli, M. J. (2013).** "Bacterial Coinfection in Influenza: A Grand Rounds Review." *JAMA* **309**, no. 3, 275-82.
- Chien, Y. W., Klugman, K. P., and Morens, D. M. (2009).** "Bacterial Pathogens and Death During the 1918 Influenza Pandemic." *N Engl J Med* **361**, no. 26, 2582-3.

- Chou, Y. Y., Heaton, N. S., Gao, Q., Palese, P., Singer, R. H., and Lionnet, T. (2013).** "Colocalization of Different Influenza Viral Rna Segments in the Cytoplasm before Viral Budding as Shown by Single-Molecule Sensitivity Fish Analysis." *PLoS Pathog* **9**, no. 5, e1003358.
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Henard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J., and Claverys, J. P. (2004).** "Interconnection of Competence, Stress and Ciar Regulons in Streptococcus Pneumoniae: Competence Triggers Stationary Phase Autolysis of Ciar Mutant Cells." *Mol Microbiol* **51**, no. 4, 1071-86.
- Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M. K., and McDaniel, L. S. (2001).** "Pspc, a Pneumococcal Surface Protein, Binds Human Factor H." *Infect Immun* **69**, no. 5, 3435-7.
- Davey, N. E., Haslam, N. J., Shields, D. C., and Edwards, R. J. (2011).** "Slimsearch 2.0: Biological Context for Short Linear Motifs in Proteins." *Nucleic Acids Res* **39**, no. Web Server issue, W56-60.
- Dawood, F. S., Iuliano, A. D., Reed, C., Meltzer, M. I., Shay, D. K., Cheng, P. Y., Bandaranayake, D., et al. (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**, no. 9, 687-95.
- Dawood, F. S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M. W., Lindstrom, S., Garten, R. J., Gubareva, L. V., et al. (2009).** "Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza a (H1n1) Virus in Humans." *N Engl J Med* **360**, no. 25, 2605-15.
- de Saizieu, A., Gardes, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T. J., Keck, W., Amrein, K. E., and Lange, R. (2000).** "Microarray-Based Identification of a Novel Streptococcus Pneumoniae Regulon Controlled by an Autoinduced Peptide." *J Bacteriol* **182**, no. 17, 4696-703.
- de Stoppelaar, S. F., Bootsma, H. J., Zomer, A., Roelofs, J. J., Hermans, P. W., van 't Veer, C., and van der Poll, T. (2013).** "Streptococcus Pneumoniae Serine Protease Htra, but Not Sfp or Prta, Is a Major Virulence Factor in Pneumonia." *PLoS One* **8**, no. 11, e80062.
- Deretic, V., and Levine, B. (2009).** "Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations." *Cell Host Microbe* **5**, no. 6, 527-49.
- Diavatopoulos, D. A., Short, K. R., Price, J. T., Wilksch, J. J., Brown, L. E., Briles, D. E., Strugnell, R. A., and Wijburg, O. L. (2010).** "Influenza a Virus Facilitates Streptococcus Pneumoniae Transmission and Disease." *FASEB J* **24**, no. 6, 1789-98.
- Didierlaurent, A., Goulding, J., Patel, S., Snelgrove, R., Low, L., Bebien, M., Lawrence, T., et al. (2008).** "Sustained Desensitization to Bacterial Toll-Like Receptor Ligands after Resolution of Respiratory Influenza Infection." *J Exp Med* **205**, no. 2, 323-9.
- Dierig, A., Heron, L. G., Lambert, S. B., Yin, J. K., Leask, J., Chow, M. Y., Sloots, T. P., et al. (2014).** "Epidemiology of Respiratory Viral Infections in Children Enrolled in a Study of Influenza Vaccine Effectiveness." *Influenza Other Respir Viruses* **8**, no. 3, 293-301.
- Dobrovolny, P. L., and Bess, D. (2011).** "Optimized Pcr-Based Detection of Mycoplasma." *J Vis Exp*, no. 52.
- Doherty, G. J., and McMahon, H. T. (2009).** "Mechanisms of Endocytosis." *Annu Rev Biochem* **78**, 857-902.
- Dorn, B. R., Dunn, W. A., Jr., and Progulsk-Fox, A. (2002).** "Bacterial Interactions with the Autophagic Pathway." *Cell Microbiol* **4**, no. 1, 1-10.
- Dorrington, M. G., Roche, A. M., Chauvin, S. E., Tu, Z., Mossman, K. L., Weiser, J. N., and Bowdish, D. M. (2013).** "Marco Is Required for Tlr2- and Nod2-Mediated Responses to Streptococcus Pneumoniae and Clearance of Pneumococcal Colonization in the Murine Nasopharynx." *J Immunol* **190**, no. 1, 250-8.
- Drexler, H. G., and Uphoff, C. C. (2002).** "Mycoplasma Contamination of Cell Cultures: Incidence, Sources, Effects, Detection, Elimination, Prevention." *Cytotechnology* **39**, no. 2, 75-90.

- Dugan, V. G., Chen, R., Spiro, D. J., Sengamalay, N., Zaborsky, J., Ghedin, E., Nolting, J., *et al.* (2008). "The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds." *PLoS Pathog* **4**, no. 5, e1000076.
- Dumit, V. I., and Dengjel, J. (2012). "Autophagosomal Protein Dynamics and Influenza Virus Infection." *Front Immunol* **3**, 43.
- Duncan, M. J., Shin, J. S., and Abraham, S. N. (2002). "Microbial Entry through Caveolae: Variations on a Theme." *Cell Microbiol* **4**, no. 12, 783-91.
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P. W., and Trombe, M. C. (2004). "Protein Serine/Threonine Kinase Stkp Positively Controls Virulence and Competence in Streptococcus Pneumoniae." *Infect Immun* **72**, no. 4, 2434-7.
- Echenique, J. R., Chapuy-Regaud, S., and Trombe, M. C. (2000). "Competence Regulation by Oxygen in Streptococcus Pneumoniae: Involvement of Ciarh and Comcde." *Mol Microbiol* **36**, no. 3, 688-96.
- Echenique, J. R., and Trombe, M. C. (2001). "Competence Modulation by the Nadh Oxidase of Streptococcus Pneumoniae Involves Signal Transduction." *J Bacteriol* **183**, no. 2, 768-72.
- Echenique, J. R., and Trombe, M. C. (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**, no. 15, 4599-608.
- Elbahesh, H., Cline, T., Baranovich, T., Govorkova, E. A., Schultz-Cherry, S., and Russell, C. J. (2014). "Novel Roles of Focal Adhesion Kinase in Cytoplasmic Entry and Replication of Influenza A Viruses." *J Virol* **88**, no. 12, 6714-28.
- Elm, C., Braathen, R., Bergmann, S., Frank, R., Vaerman, J. P., Kaetzel, C. S., Chhatwal, G. S., Johansen, F. E., and Hammerschmidt, S. (2004). "Ectodomains 3 and 4 of Human Polymeric Immunoglobulin Receptor (HpigR) Mediate Invasion of Streptococcus Pneumoniae into the Epithelium." *J Biol Chem* **279**, no. 8, 6296-304.
- Elm, C., Rohde, M., Vaerman, J. P., Chhatwal, G. S., and Hammerschmidt, S. (2004). "Characterization of the Interaction of the Pneumococcal Surface Protein SpsA with the Human Polymeric Immunoglobulin Receptor (HpigR)." *Indian J Med Res* **119 Suppl**, 61-5.
- Engelich, G., White, M., and Hartshorn, K. L. (2001). "Neutrophil Survival Is Markedly Reduced by Incubation with Influenza Virus and Streptococcus Pneumoniae: Role of Respiratory Burst." *J Leukoc Biol* **69**, no. 1, 50-6.
- Fabret, C., and Hoch, J. A. (1998). "A Two-Component Signal Transduction System Essential for Growth of Bacillus Subtilis: Implications for Anti-Infective Therapy." *J Bacteriol* **180**, no. 23, 6375-83.
- Fader, C. M., Aguilera, M. O., and Colombo, M. I. (2014). "Autophagy Response: Manipulating the Mtor-Controlled Machinery by Amino Acids and Pathogens." *Amino Acids*.
- Fedrigo, G. V., Campoy, E. M., Di Venanzio, G., Colombo, M. I., and Garcia Vescovi, E. (2011). "Serratia Marcescens Is Able to Survive and Proliferate in Autophagic-Like Vacuoles inside Non-Phagocytic Cells." *PLoS One* **6**, no. 8, e24054.
- Fillon, S., Soulis, K., Rajasekaran, S., Benedict-Hamilton, H., Radin, J. N., Orihuela, C. J., El Kasm, K. C., *et al.* (2006). "Platelet-Activating Factor Receptor and Innate Immunity: Uptake of Gram-Positive Bacterial Cell Wall into Host Cells and Cell-Specific Pathophysiology." *J Immunol* **177**, no. 9, 6182-91.
- Fortier, A. H., Leiby, D. A., Narayanan, R. B., Asafodjei, E., Crawford, R. M., Nacy, C. A., and Meltzer, M. S. (1995). "Growth of Francisella Tularensis Lvs in Macrophages: The Acidic Intracellular Compartment Provides Essential Iron Required for Growth." *Infect Immun* **63**, no. 4, 1478-83.
- Foster, J. W. (1999). "When Protons Attack: Microbial Strategies of Acid Adaptation." *Curr Opin Microbiol* **2**, no. 2, 170-4.

- Foster, J. W., and Moreno, M. (1999).** "Inducible Acid Tolerance Mechanisms in Enteric Bacteria." *Novartis Found Symp* **221**, 55-69; discussion 70-4.
- Fredlund, J., and Enninga, J. (2014).** "Cytoplasmic Access by Intracellular Bacterial Pathogens." *Trends Microbiol* **22**, no. 3, 128-37.
- Fujiyoshi, Y., Kume, N. P., Sakata, K., and Sato, S. B. (1994).** "Fine Structure of Influenza a Virus Observed by Electron Cryo-Microscopy." *EMBO J* **13**, no. 2, 318-26.
- Gannage, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Ramer, P. C., Lee, M., et al. (2009).** "Matrix Protein 2 of Influenza a Virus Blocks Autophagosome Fusion with Lysosomes." *Cell Host Microbe* **6**, no. 4, 367-80.
- Garvis, S. G., Beuzon, C. R., and Holden, D. W. (2001).** "A Role for the Phop/Q Regulon in Inhibition of Fusion between Lysosomes and Salmonella-Containing Vacuoles in Macrophages." *Cell Microbiol* **3**, no. 11, 731-44.
- Ghaffar, F., Friedland, I. R., and McCracken, G. H., Jr. (1999).** "Dynamics of Nasopharyngeal Colonization by Streptococcus Pneumoniae." *Pediatr Infect Dis J* **18**, no. 7, 638-46.
- Ghoneim, H. E., Thomas, P. G., and McCullers, J. A. (2013).** "Depletion of Alveolar Macrophages During Influenza Infection Facilitates Bacterial Superinfections." *J Immunol* **191**, no. 3, 1250-9.
- Giammarinaro, P., Sicard, M., and Gasc, A. M. (1999).** "Genetic and Physiological Studies of the CiaH-CiaR Two-Component Signal-Transducing System Involved in Cefotaxime Resistance and Competence of Streptococcus Pneumoniae." *Microbiology* **145 (Pt 8)**, 1859-69.
- Gobel, U., Butler, G. H., and Stanbridge, E. J. (1984).** "Comparative Analysis of Mycoplasma Ribosomal Rna Operons." *Isr J Med Sci* **20**, no. 9, 762-4.
- Gosink, K. K., Mann, E. R., Guglielmo, C., Tuomanen, E. I., and Masure, H. R. (2000).** "Role of Novel Choline Binding Proteins in Virulence of Streptococcus Pneumoniae." *Infect Immun* **68**, no. 10, 5690-5.
- Gradstedt, H., Iovino, F., and Bijlsma, J. J. (2013).** "Streptococcus Pneumoniae Invades Endothelial Host Cells Via Multiple Pathways and Is Killed in a Lysosome Dependent Manner." *PLoS One* **8**, no. 6, e65626.
- Graham, R. M., and Paton, J. C. (2006).** "Differential Role of Cbpa and Pspa in Modulation of in Vitro Cxc Chemokine Responses of Respiratory Epithelial Cells to Infection with Streptococcus Pneumoniae." *Infect Immun* **74**, no. 12, 6739-49.
- Grigg, J. (2012).** "The Platelet Activating Factor Receptor: A New Anti-Infective Target in Respiratory Disease?". *Thorax* **67**, no. 9, 840-1.
- Grigg, J., Walters, H., Sohal, S. S., Wood-Baker, R., Reid, D. W., Xu, C. B., Edvinsson, L., et al. (2012).** "Cigarette Smoke and Platelet-Activating Factor Receptor Dependent Adhesion of Streptococcus Pneumoniae to Lower Airway Cells." *Thorax* **67**, no. 10, 908-13.
- Groban, E. S., Clarke, E. J., Salis, H. M., Miller, S. M., and Voigt, C. A. (2009).** "Kinetic Buffering of Cross Talk between Bacterial Two-Component Sensors." *J Mol Biol* **390**, no. 3, 380-93.
- Grove, J., and Marsh, M. (2011).** "The Cell Biology of Receptor-Mediated Virus Entry." *J Cell Biol* **195**, no. 7, 1071-82.
- Guenzi, E., Gasc, A. M., Sicard, M. A., and Hakenbeck, R. (1994).** "A Two-Component Signal-Transducing System Is Involved in Competence and Penicillin Susceptibility in Laboratory Mutants of Streptococcus Pneumoniae." *Mol Microbiol* **12**, no. 3, 505-15.
- Guenzi, E., and Hakenbeck, R. (1995).** "Genetic Competence and Susceptibility to Beta-Lactam Antibiotics in Streptococcus Pneumoniae R6 Are Linked Via a Two-Component Signal-Transducing System Cia." *Dev Biol Stand* **85**, 125-8.
- Gupta, R., Yang, J., Dong, Y., Swiatlo, E., Zhang, J. R., Metzger, D. W., and Bai, G. (2013).** "Deletion of ArcD in Streptococcus Pneumoniae D39 Impairs Its Capsule and Attenuates Virulence." *Infect Immun* **81**, no. 10, 3903-11.

- Gutierrez-Ortega, A., Sanchez-Hernandez, C., and Gomez-Garcia, B. (2008).** "Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins Uptake Occurs through Clathrin-Mediated Endocytosis in a Human Epithelial Cell Line." *Virology* **5**, 127.
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., and Deretic, V. (2004).** "Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting Bcg and Mycobacterium Tuberculosis Survival in Infected Macrophages." *Cell* **119**, no. 6, 753-66.
- Gutierrez, M. G., Vazquez, C. L., Munafo, D. B., Zoppino, F. C., Beron, W., Rabinovitch, M., and Colombo, M. I. (2005).** "Autophagy Induction Favours the Generation and Maturation of the Coxiella-Replicative Vacuoles." *Cell Microbiol* **7**, no. 7, 981-93.
- Hahn, I., Klaus, A., Janze, A. K., Steinwede, K., Ding, N., Bohling, J., Brumshagen, C., et al. (2011).** "Cathepsin G and Neutrophil Elastase Play Critical and Nonredundant Roles in Lung-Protective Immunity against Streptococcus Pneumoniae in Mice." *Infect Immun* **79**, no. 12, 4893-901.
- Halfmann, A., Schnorpfel, A., Muller, M., Marx, P., Gunzler, U., Hakenbeck, R., and Bruckner, R. (2011).** "Activity of the Two-Component Regulatory System CiaRH in Streptococcus Pneumoniae R6." *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**, no. 2, 96-104.
- Hammerschmidt, S., Talay, S. R., Brandtzaeg, P., and Chhatwal, G. S. (1997).** "SpsA, a Novel Pneumococcal Surface Protein with Specific Binding to Secretory Immunoglobulin A and Secretory Component." *Mol Microbiol* **25**, no. 6, 1113-24.
- Hammerschmidt, S., Tillig, M. P., Wolff, S., Vaerman, J. P., and Chhatwal, G. S. (2000).** "Species-Specific Binding of Human Secretory Component to SpsA Protein of Streptococcus Pneumoniae Via a Hexapeptide Motif." *Mol Microbiol* **36**, no. 3, 726-36.
- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Muller, E., and Rohde, M. (2005).** "Illustration of Pneumococcal Polysaccharide Capsule During Adherence and Invasion of Epithelial Cells." *Infect Immun* **73**, no. 8, 4653-67.
- Hartel, T., Eylert, E., Schulz, C., Petruschka, L., Gierok, P., Grubmuller, S., Lalk, M., Eisenreich, W., and Hammerschmidt, S. (2012).** "Characterization of Central Carbon Metabolism of Streptococcus Pneumoniae by Isotopologue Profiling." *J Biol Chem* **287**, no. 6, 4260-74.
- Hava, D. L., and Camilli, A. (2002).** "Large-Scale Identification of Serotype 4 Streptococcus Pneumoniae Virulence Factors." *Mol Microbiol* **45**, no. 5, 1389-406.
- Hava, D. L., LeMieux, J., and Camilli, A. (2003).** "From Nose to Lung: The Regulation Behind Streptococcus Pneumoniae Virulence Factors." *Mol Microbiol* **50**, no. 4, 1103-10.
- Havarstein, L. S., Coomaraswamy, G., and Morrison, D. A. (1995).** "An Unmodified Heptadecapeptide Pheromone Induces Competence for Genetic Transformation in Streptococcus Pneumoniae." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, no. 24, 11140-4.
- Havarstein, L. S., Diep, D. B., and Nes, I. F. (1995).** "A Family of Bacteriocin ABC Transporters Carry out Proteolytic Processing of Their Substrates Concomitant with Export." *Mol Microbiol* **16**, no. 2, 229-40.
- Helaine, S., Cheverton, A. M., Watson, K. G., Faure, L. M., Matthews, S. A., and Holden, D. W. (2014).** "Internalization of Salmonella by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters." *Science* **343**, no. 6167, 204-8.
- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J., and McNiven, M. A. (1998).** "Dynamin-Mediated Internalization of Caveolae." *J Cell Biol* **141**, no. 1, 85-99.
- Henriques-Normark, B., and Tuomanen, E. I. (2013).** "The Pneumococcus: Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis." *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, no. 7.
- Hirst, R. A., Gosai, B., Rutman, A., Guerin, C. J., Nicotera, P., Andrew, P. W., and O'Callaghan, C. (2008).** "Streptococcus Pneumoniae Deficient in Pneumolysin or Autolysin Has Reduced Virulence in Meningitis." *J Infect Dis* **197**, no. 5, 744-51.
- Hoch, J. A. (2000).** "Two-Component and Phosphorelay Signal Transduction." *Curr Opin Microbiol* **3**, no. 2, 165-70.

- Hornef, M. W., Wick, M. J., Rhen, M., and Normark, S. (2002).** "Bacterial Strategies for Overcoming Host Innate and Adaptive Immune Responses." *Nat Immunol* **3**, no. 11, 1033-40.
- Hoyle, L., and Fairbrother, R. W. (1937).** "Isolation of Influenza Virus: The Manchester Epidemic." *Br Med J* **1**, no. 3977, 655-7.
- Hu, D. K., Wang, D. G., Liu, Y., Liu, C. B., Yu, L. H., Qu, Y., Luo, X. H., et al. (2013).** "Roles of Virulence Genes (PsaA and CpsA) on the Invasion of *Streptococcus Pneumoniae* into Blood System." *Eur J Med Res* **18**, 14.
- Huang, J., Lam, G. Y., and Brumell, J. H. (2011).** "Autophagy Signaling through Reactive Oxygen Species." *Antioxid Redox Signal* **14**, no. 11, 2215-31.
- Huang, X., Liu, T., Muller, J., Levandowski, R. A., and Ye, Z. (2001).** "Effect of Influenza Virus Matrix Protein and Viral Rna on Ribonucleoprotein Formation and Nuclear Export." *Virology* **287**, no. 2, 405-16.
- Hui, F. M., Zhou, L., and Morrison, D. A. (1995).** "Competence for Genetic Transformation in *Streptococcus Pneumoniae*: Organization of a Regulatory Locus with Homology to Two Lactococcal Secretion Genes." *Gene* **153**, no. 1, 25-31.
- Humphries, A. C., and Way, M. (2013).** "The Non-Canonical Roles of Clathrin and Actin in Pathogen Internalization, Egress and Spread." *Nat Rev Microbiol* **11**, no. 8, 551-60.
- Huotari, J., and Helenius, A. (2011).** "Endosome Maturation." *EMBO J* **30**, no. 17, 3481-500.
- Hutagalung, A. H., and Novick, P. J. (2011).** "Role of Rab Gtpases in Membrane Traffic and Cell Physiology." *Physiol Rev* **91**, no. 1, 119-49.
- Ibrahim, Y. M., Kerr, A. R., McCluskey, J., and Mitchell, T. J. (2004).** "Control of Virulence by the Two-Component System CiaR/H Is Mediated Via HtrA, a Major Virulence Factor of *Streptococcus Pneumoniae*." *J Bacteriol* **186**, no. 16, 5258-66.
- Imlay, J. A. (2002).** "How Oxygen Damages Microbes: Oxygen Tolerance and Obligate Anaerobiosis." *Adv Microb Physiol* **46**, 111-53.
- Imlay, J. A., Chin, S. M., and Linn, S. (1988).** "Toxic DNA Damage by Hydrogen Peroxide through the Fenton Reaction in Vivo and in Vitro." *Science* **240**, no. 4852, 640-2.
- Iovino, F., Brouwer, M. C., van de Beek, D., Molema, G., and Bijlsma, J. J. (2013).** "Signalling or Binding: The Role of the Platelet-Activating Factor Receptor in Invasive Pneumococcal Disease." *Cell Microbiol* **15**, no. 6, 870-81.
- Iovino, F., Molema, G., and Bijlsma, J. J. (2014).** "Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, a Putative Receptor for the Adhesion of *Streptococcus Pneumoniae* to the Vascular Endothelium of the Blood-Brain Barrier." *Infect Immun* **82**, no. 9, 3555-66.
- Iovino, F., Molema, G., and Bijlsma, J. J. (2014).** "*Streptococcus Pneumoniae* Interacts with PIGRP Expressed by the Brain Microvascular Endothelium but Does Not Co-Localize with PAF Receptor." *PLoS One* **9**, no. 5, e97914.
- Ishizuka, S., Yamaya, M., Suzuki, T., Nakayama, K., Kamanaka, M., Ida, S., Sekizawa, K., and Sasaki, H. (2001).** "Acid Exposure Stimulates the Adherence of *Streptococcus Pneumoniae* to Cultured Human Airway Epithelial Cells: Effects on Platelet-Activating Factor Receptor Expression." *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, no. 4, 459-68.
- Jackson, D., Hossain, M. J., Hickman, D., Perez, D. R., and Lamb, R. A. (2008).** "A New Influenza Virus Virulence Determinant: The NS1 Protein Four C-Terminal Residues Modulate Pathogenicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, no. 11, 4381-6.
- Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K. A., Wills, N. M., Xiao, Y. L., Dunfee, R. L., et al. (2012).** "An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response." *Science* **337**, no. 6091, 199-204.
- James, D. B., and Yother, J. (2012).** "Genetic and Biochemical Characterizations of Enzymes Involved in *Streptococcus Pneumoniae* Serotype 2 Capsule Synthesis Demonstrate That Cps2T (Wchf) Catalyzes the Committed Step by Addition of Beta-1,4-Rhamnose, the Second Sugar Residue in the Repeat Unit." *J Bacteriol* **194**, no. 23, 6479-89.

- Janke, R., Genzel, Y., Wetzel, M., and Reichl, U. (2011). "Effect of Influenza Virus Infection on Key Metabolic Enzyme Activities in Mdck Cells." *BMC Proc* **5 Suppl 8**, P129.
- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). "Selective Autophagy Mediated by Autophagic Adapter Proteins." *Autophagy* **7**, no. 3, 279-96.
- Johansson, K. E., Johansson, I., and Gobel, U. B. (1990). "Evaluation of Different Hybridization Procedures for the Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures." *Mol Cell Probes* **4**, no. 1, 33-42.
- Jomaa, M., Yuste, J., Paton, J. C., Jones, C., Dougan, G., and Brown, J. S. (2005). "Antibodies to the Iron Uptake Abc Transporter Lipoproteins Piaa and PiuA Promote Opsonophagocytosis of Streptococcus Pneumoniae." *Infect Immun* **73**, no. 10, 6852-9.
- Jonsson, S., Musher, D. M., Chapman, A., Goree, A., and Lawrence, E. C. (1985). "Phagocytosis and Killing of Common Bacterial Pathogens of the Lung by Human Alveolar Macrophages." *J Infect Dis* **152**, no. 1, 4-13.
- Jung, K., Fried, L., Behr, S., and Heermann, R. (2012). "Histidine Kinases and Response Regulators in Networks." *Curr Opin Microbiol* **15**, no. 2, 118-24.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). "Lc3, a Mammalian Homologue of Yeast Apg8p, Is Localized in Autophagosomal Membranes after Processing." *EMBO J* **19**, no. 21, 5720-8.
- Kadioglu, A., Echenique, J., Manco, S., Trombe, M. C., and Andrew, P. W. (2003). "The MicA Two-Component Signaling System Is Involved in Virulence of Streptococcus Pneumoniae." *Infect Immun* **71**, no. 11, 6676-9.
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., and Andrew, P. W. (2008). "The Role of Streptococcus Pneumoniae Virulence Factors in Host Respiratory Colonization and Disease." *Nat Rev Microbiol* **6**, no. 4, 288-301.
- Kaetzel, C. S. (2001). "Polymeric Ig Receptor: Defender of the Fort or Trojan Horse?". *Curr Biol* **11**, no. 1, R35-8.
- Kash, J. C., and Taubenberger, J. K. (2015). "The Role of Viral, Host, and Secondary Bacterial Factors in Influenza Pathogenesis." *Am J Pathol* **185**, no. 6, 1528-36.
- Kash, J. C., Walters, K. A., Davis, A. S., Sandouk, A., Schwartzman, L. M., Jagger, B. W., Chertow, D. S., et al. (2011). "Lethal Synergism of 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus and Streptococcus Pneumoniae Coinfection Is Associated with Loss of Murine Lung Repair Responses." *MBio* **2**, no. 5.
- Kern, J. M., Maass, V., and Maass, M. (2009). "Molecular Pathogenesis of Chronic Chlamydia Pneumoniae Infection: A Brief Overview." *Clin Microbiol Infect* **15**, no. 1, 36-41.
- Kerr, A. R., Paterson, G. K., McCluskey, J., Iannelli, F., Oggioni, M. R., Pozzi, G., and Mitchell, T. J. (2006). "The Contribution of PspC to Pneumococcal Virulence Varies between Strains and Is Accomplished by Both Complement Evasion and Complement-Independent Mechanisms." *Infect Immun* **74**, no. 9, 5319-24.
- Kim, M., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., and Sasakawa, C. (2010). "Bacterial Interactions with the Host Epithelium." *Cell Host Microbe* **8**, no. 1, 20-35.
- King, Q. O., Lei, B., and Harmsen, A. G. (2009). "Pneumococcal Surface Protein a Contributes to Secondary Streptococcus Pneumoniae Infection after Influenza Virus Infection." *J Infect Dis* **200**, no. 4, 537-45.
- King, S. J., Hippe, K. R., and Weiser, J. N. (2006). "Deglycosylation of Human Glycoconjugates by the Sequential Activities of Exoglycosidases Expressed by Streptococcus Pneumoniae." *Mol Microbiol* **59**, no. 3, 961-74.
- Kjos, M., Aprianto, R., Fernandes, V. E., Andrew, P. W., van Strijp, J. A., Nijland, R., and Veening, J. W. (2015). "Bright Fluorescent Streptococcus Pneumoniae for Live-Cell Imaging of Host-Pathogen Interactions." *J Bacteriol* **197**, no. 5, 807-18.
- Klemperer, H. (1961). "Glucose Breakdown in Chick Embryo Cells Infected with Influenza Virus." *Virology* **13**, 68-77.

- Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., et al. (2012).** "Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy." *Autophagy* **8**, no. 4, 445-544.
- Klionsky, D. J., Eskelinen, E. L., and Deretic, V. (2014).** "Autophagosomes, Phagosomes, Autolysosomes, Phagolysosomes, Autophagolysosomes... Wait, I'm Confused." *Autophagy* **10**, no. 4, 549-51.
- Kohlmeier, J. E., and Woodland, D. L. (2009).** "Immunity to Respiratory Viruses." *Annu Rev Immunol* **27**, 61-82.
- Kolumam, G. A., Thomas, S., Thompson, L. J., Sprent, J., and Murali-Krishna, K. (2005).** "Type I Interferons Act Directly on Cd8 T Cells to Allow Clonal Expansion and Memory Formation in Response to Viral Infection." *J Exp Med* **202**, no. 5, 637-50.
- Koppe, U., Hogner, K., Doehn, J. M., Muller, H. C., Witzentrath, M., Gutbier, B., Bauer, S., et al. (2012).** "Streptococcus Pneumoniae Stimulates a Sting- and Ifn Regulatory Factor 3-Dependent Type I Ifn Production in Macrophages, Which Regulates Rantes Production in Macrophages, Cocultured Alveolar Epithelial Cells, and Mouse Lungs." *J Immunol* **188**, no. 2, 811-7.
- Koppstein, D., Ashour, J., and Bartel, D. P. (2015).** "Sequencing the Cap-Snatching Repertoire of H1n1 Influenza Provides Insight into the Mechanism of Viral Transcription Initiation." *Nucleic Acids Res* **43**, no. 10, 5052-64.
- Kosai, K., Seki, M., Tanaka, A., Morinaga, Y., Imamura, Y., Izumikawa, K., Kakeya, H., et al. (2011).** "Increase of Apoptosis in a Murine Model for Severe Pneumococcal Pneumonia During Influenza a Virus Infection." *Jpn J Infect Dis* **64**, no. 6, 451-7.
- Kostrzynska, M., and Wadstrom, T. (1992).** "Binding of Laminin, Type Iv Collagen, and Vitronectin by Streptococcus Pneumoniae." *Zentralbl Bakteriol* **277**, no. 1, 80-3.
- Krug, R. M. (1981).** "Priming of Influenza Viral Rna Transcription by Capped Heterologous Rnas." *Curr Top Microbiol Immunol* **93**, 125-49.
- Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., Golda, A., et al. (2008).** "A Potential New Pathway for Staphylococcus Aureus Dissemination: The Silent Survival of S. Aureus Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages." *PLoS One* **3**, no. 1, e1409.
- Kummer, S., Flottmann, M., Schwanhauser, B., Sieben, C., Veit, M., Selbach, M., Klipp, E., and Herrmann, A. (2014).** "Alteration of Protein Levels During Influenza Virus H1n1 Infection in Host Cells: A Proteomic Survey of Host and Virus Reveals Differential Dynamics." *PLoS One* **9**, no. 4, e94257.
- Lakadamyali, M., Rust, M. J., and Zhuang, X. (2004).** "Endocytosis of Influenza Viruses." *Microbes Infect* **6**, no. 10, 929-36.
- Lange, R., Wagner, C., de Saizieu, A., Flint, N., Molnos, J., Stieger, M., Caspers, P., et al. (1999).** "Domain Organization and Molecular Characterization of 13 Two-Component Systems Identified by Genome Sequencing of Streptococcus Pneumoniae." *Gene* **237**, no. 1, 223-34.
- Lanie, J. A., Ng, W. L., Kazmierczak, K. M., Andrzejewski, T. M., Davidsen, T. M., Wayne, K. J., Tettelin, H., Glass, J. I., and Winkler, M. E. (2007).** "Genome Sequence of Avery's Virulent Serotype 2 Strain D39 of Streptococcus Pneumoniae and Comparison with That of Unencapsulated Laboratory Strain R6." *J Bacteriol* **189**, no. 1, 38-51.
- Lau, G. W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S. E., Marra, A., Bryant, A. P., McDevitt, D., Morrison, D. A., and Holden, D. W. (2001).** "A Functional Genomic Analysis of Type 3 Streptococcus Pneumoniae Virulence." *Mol Microbiol* **40**, no. 3, 555-71.
- Lazarowitz, S. G., Compans, R. W., and Choppin, P. W. (1973).** "Proteolytic Cleavage of the Hemagglutinin Polypeptide of Influenza Virus. Function of the Uncleaved Polypeptide Ha." *Virology* **52**, no. 1, 199-212.

- Le Roy, C., and Wrana, J. L. (2005).** "Clathrin- and Non-Clathrin-Mediated Endocytic Regulation of Cell Signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, no. 2, 112-26.
- Lear, J. D. (2003).** "Proton Conduction through the M2 Protein of the Influenza A Virus; a Quantitative, Mechanistic Analysis of Experimental Data." *FEBS Lett* **552**, no. 1, 17-22.
- Lee, J. O., Kim, J. Y., Rhee, D. K., and Pyo, S. (2013).** "Streptococcus Pneumoniae Clpp Protease Induces Apoptosis Via Caspase-Independent Pathway in Human Neuroblastoma Cells: Cytoplasmic Relocalization of P53." *Toxicon* **70**, 142-52.
- Lee, M. S., and Morrison, D. A. (1999).** "Identification of a New Regulator in Streptococcus Pneumoniae Linking Quorum Sensing to Competence for Genetic Transformation." *J Bacteriol* **181**, no. 16, 5004-16.
- Lee, M. S., Seok, C., and Morrison, D. A. (1998).** "Insertion-Duplication Mutagenesis in Streptococcus Pneumoniae: Targeting Fragment Length Is a Critical Parameter in Use as a Random Insertion Tool." *Appl Environ Microbiol* **64**, no. 12, 4796-802.
- Lee, W. J., Chen, L. K., Tang, G. J., and Lan, T. Y. (2014).** "The Impact of Influenza Vaccination on Hospitalizations and Mortality among Frail Older People." *J Am Med Dir Assoc* **15**, no. 4, 256-60.
- LeMessurier, K. S., Hacker, H., Chi, L., Tuomanen, E., and Redecke, V. (2013).** "Type I Interferon Protects against Pneumococcal Invasive Disease by Inhibiting Bacterial Transmigration across the Lung." *PLoS Pathog* **9**, no. 11, e1003727.
- LeMessurier, K. S., Ogunniyi, A. D., and Paton, J. C. (2006).** "Differential Expression of Key Pneumococcal Virulence Genes in Vivo." *Microbiology* **152**, no. Pt 2, 305-11.
- Lemon, J. K., and Weiser, J. N. (2015).** "Degradation Products of the Extracellular Pathogen Streptococcus Pneumoniae Access the Cytosol Via Its Pore-Forming Toxin." *MBio* **6**, no. 1.
- Leser, G. P., and Lamb, R. A. (2005).** "Influenza Virus Assembly and Budding in Raft-Derived Microdomains: A Quantitative Analysis of the Surface Distribution of Ha, Na and M2 Proteins." *Virology* **342**, no. 2, 215-27.
- Levine, B. (2005).** "Eating Oneself and Uninvited Guests: Autophagy-Related Pathways in Cellular Defense." *Cell* **120**, no. 2, 159-62.
- Levine, B., and Deretic, V. (2007).** "Unveiling the Roles of Autophagy in Innate and Adaptive Immunity." *Nat Rev Immunol* **7**, no. 10, 767-77.
- Levine, O. S., O'Brien, K. L., Knoll, M., Adegbola, R. A., Black, S., Cherian, T., Dagan, R., et al. (2006).** "Pneumococcal Vaccination in Developing Countries." *Lancet* **367**, no. 9526, 1880-2.
- Lewis, K. (2000).** "Programmed Death in Bacteria." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, no. 3, 503-14.
- Li, N., Wang, F., Niu, S., Cao, J., Wu, K., Li, Y., Yin, N., et al. (2009).** "Discovery of Novel Inhibitors of Streptococcus Pneumoniae Based on the Virtual Screening with the Homology-Modeled Structure of Histidine Kinase (Vick)." *BMC Microbiol* **9**, 129.
- Li, W., Moltedo, B., and Moran, T. M. (2012).** "Type I Interferon Induction During Influenza Virus Infection Increases Susceptibility to Secondary Streptococcus Pneumoniae Infection by Negative Regulation of Gammadelta T Cells." *J Virol* **86**, no. 22, 12304-12.
- Lipscomb, M. F., Hutt, J., Lovchik, J., Wu, T., and Lyons, C. R. (2010).** "The Pathogenesis of Acute Pulmonary Viral and Bacterial Infections: Investigations in Animal Models." *Annu Rev Pathol* **5**, 223-52.
- Liu, X., Han, Q., and Leng, J. (2014).** "Analysis of Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Proteins in a Murine Model of Pneumococcal Meningitis." *BMC Infect Dis* **14**, 648.
- Lu, L., Lamm, M. E., Li, H., Corthesy, B., and Zhang, J. R. (2003).** "The Human Polymeric Immunoglobulin Receptor Binds to Streptococcus Pneumoniae Via Domains 3 and 4." *J Biol Chem* **278**, no. 48, 48178-87.
- Lu, L., Ma, Y., and Zhang, J. R. (2006).** "Streptococcus Pneumoniae Recruits Complement Factor H through the Amino Terminus of Cbpa." *J Biol Chem* **281**, no. 22, 15464-74.

- Luo, P., Li, H., and Morrison, D. A. (2003).** "Comx Is a Unique Link between Multiple Quorum Sensing Outputs and Competence in *Streptococcus Pneumoniae*." *Mol Microbiol* **50**, no. 2, 623-33.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., and Wozniak, D. J. (2009).** "Assembly and Development of the *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Matrix." *PLoS Pathog* **5**, no. 3, e1000354.
- Mahdi, L. K., Ebrahimie, E., Adelson, D. L., Paton, J. C., and Oggunniyi, A. D. (2013).** "A Transcription Factor Contributes to Pathogenesis and Virulence in *Streptococcus Pneumoniae*." *PLoS One* **8**, no. 8, e70862.
- Malik-Kale, P., Jolly, C. E., Lathrop, S., Winfree, S., Luterbach, C., and Steele-Mortimer, O. (2011).** "Salmonella - at Home in the Host Cell." *Front Microbiol* **2**, 125.
- Mandell, D. a. B. s. (2011).** "Principles and Practices of Infectious Diseases." *Elsevier*.
- Mandell, G. L., and Coleman, E. J. (2000).** "Activities of Antimicrobial Agents against Intracellular Pneumococci." *Antimicrob Agents Chemother* **44**, no. 9, 2561-3.
- Mao, H., Tu, W., Qin, G., Law, H. K., Sia, S. F., Chan, P. L., Liu, Y., et al. (2009).** "Influenza Virus Directly Infects Human Natural Killer Cells and Induces Cell Apoptosis." *J Virol* **83**, no. 18, 9215-22.
- Marra, A., Lawson, S., Asundi, J. S., Brigham, D., and Hromockyj, A. E. (2002).** "In Vivo Characterization of the Psa Genes from *Streptococcus Pneumoniae* in Multiple Models of Infection." *Microbiology* **148**, no. Pt 5, 1483-91.
- Marriott, H. M., and Dockrell, D. H. (2006).** "Streptococcus Pneumoniae: The Role of Apoptosis in Host Defense and Pathogenesis." *Int J Biochem Cell Biol* **38**, no. 11, 1848-54.
- Marriott, H. M., Mitchell, T. J., and Dockrell, D. H. (2008).** "Pneumolysin: A Double-Edged Sword During the Host-Pathogen Interaction." *Curr Mol Med* **8**, no. 6, 497-509.
- Martin-Galiano, A. J., Overweg, K., Ferrandiz, M. J., Reuter, M., Wells, J. M., and de la Campa, A. G. (2005).** "Transcriptional Analysis of the Acid Tolerance Response in *Streptococcus Pneumoniae*." *Microbiology* **151**, no. Pt 12, 3935-46.
- Martin, B., Prudhomme, M., Alloing, G., Granadel, C., and Claverys, J. P. (2000).** "Cross-Regulation of Competence Pheromone Production and Export in the Early Control of Transformation in *Streptococcus Pneumoniae*." *Mol Microbiol* **38**, no. 4, 867-78.
- Martin, K., and Helenius, A. (1991).** "Nuclear Transport of Influenza Virus Ribonucleoproteins: The Viral Matrix Protein (M1) Promotes Export and Inhibits Import." *Cell* **67**, no. 1, 117-30.
- Martin, K., and Helenius, A. (1991).** "Transport of Incoming Influenza Virus Nucleocapsids into the Nucleus." *J Virol* **65**, no. 1, 232-44.
- Martin, P. K., Li, T., Sun, D., Biek, D. P., and Schmid, M. B. (1999).** "Role in Cell Permeability of an Essential Two-Component System in *Staphylococcus Aureus*." *J Bacteriol* **181**, no. 12, 3666-73.
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J. C., and Wold, A. E. (2008).** "Pneumolysin Released During *Streptococcus Pneumoniae* Autolysis Is a Potent Activator of Intracellular Oxygen Radical Production in Neutrophils." *Infect Immun* **76**, no. 9, 4079-87.
- Marx, P., Meiers, M., and Bruckner, R. (2014).** "Activity of the Response Regulator Ciar in Mutants of *Streptococcus Pneumoniae* R6 Altered in Acetyl Phosphate Production." *Front Microbiol* **5**, 772.
- Mascher, T., Heintz, M., Zahner, D., Merai, M., and Hakenbeck, R. (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**, no. 5, 1959-68.
- Matrosovich, M. N., Gambaryan, A. S., Teneberg, S., Piskarev, V. E., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., Robertson, J. S., and Karlsson, K. A. (1997).** "Avian Influenza a Viruses Differ from Human Viruses by Recognition of Sialyloligosaccharides and Gangliosides and by a Higher Conservation of the Ha Receptor-Binding Site." *Virology* **233**, no. 1, 224-34.

- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., and Klenk, H. D. (2004).** "Human and Avian Influenza Viruses Target Different Cell Types in Cultures of Human Airway Epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, no. 13, 4620-4.
- McAuley, J. L., Chipuk, J. E., Boyd, K. L., Van De Velde, N., Green, D. R., and McCullers, J. A. (2010).** "Pb1-F2 Proteins from H5n1 and 20 Century Pandemic Influenza Viruses Cause Immunopathology." *PLoS Pathog* **6**, no. 7, e1001014.
- McAuley, J. L., Hornung, F., Boyd, K. L., Smith, A. M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J. W., and McCullers, J. A. (2007).** "Expression of the 1918 Influenza a Virus Pb1-F2 Enhances the Pathogenesis of Viral and Secondary Bacterial Pneumonia." *Cell Host Microbe* **2**, no. 4, 240-9.
- McAuley, J. L., Zhang, K., and McCullers, J. A. (2010).** "The Effects of Influenza a Virus Pb1-F2 Protein on Polymerase Activity Are Strain Specific and Do Not Impact Pathogenesis." *J Virol* **84**, no. 1, 558-64.
- McClain, M. S., Schraw, W., Ricci, V., Boquet, P., and Cover, T. L. (2000).** "Acid Activation of Helicobacter Pylori Vacuolating Cytotoxin (Vaca) Results in Toxin Internalization by Eukaryotic Cells." *Mol Microbiol* **37**, no. 2, 433-42.
- McCluskey, J., Hinds, J., Husain, S., Witney, A., and Mitchell, T. J. (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**, no. 6, 1661-75.
- McCullers, J. A. (2014).** "The Co-Pathogenesis of Influenza Viruses with Bacteria in the Lung." *Nat Rev Microbiol* **12**, no. 4, 252-62.
- McCullers, J. A. (2006).** "Insights into the Interaction between Influenza Virus and Pneumococcus." *Clin Microbiol Rev* **19**, no. 3, 571-82.
- McCullers, J. A., and Bartmess, K. C. (2003).** "Role of Neuraminidase in Lethal Synergism between Influenza Virus and Streptococcus Pneumoniae." *J Infect Dis* **187**, no. 6, 1000-9.
- McCullers, J. A., and Rehg, J. E. (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**, no. 3, 341-50.
- McGarrity, G. J. (1976).** "Spread and Control of Mycoplasmal Infection of Cell Cultures." *In Vitro* **12**, no. 9, 643-8.
- McNamee, L. A., and Harmsen, A. G. (2006).** "Both Influenza-Induced Neutrophil Dysfunction and Neutrophil-Independent Mechanisms Contribute to Increased Susceptibility to a Secondary Streptococcus Pneumoniae Infection." *Infect Immun* **74**, no. 12, 6707-21.
- Medina, E., Goldmann, O., Toppel, A. W., and Chhatwal, G. S. (2003).** "Survival of Streptococcus Pyogenes within Host Phagocytic Cells: A Pathogenic Mechanism for Persistence and Systemic Invasion." *J Infect Dis* **187**, no. 4, 597-603.
- Meijer, A. J., Lorin, S., Blommaert, E. F., and Codogno, P. (2014).** "Regulation of Autophagy by Amino Acids and Mtor-Dependent Signal Transduction." *Amino Acids*.
- Mestecky, J., Moldoveanu, Z., and Elson, C. O. (2005).** "Immune Response Versus Mucosal Tolerance to Mucosally Administered Antigens." *Vaccine* **23**, no. 15, 1800-3.
- Metzger, D. W., and Sun, K. (2013).** "Immune Dysfunction and Bacterial Coinfections Following Influenza." *J Immunol* **191**, no. 5, 2047-52.
- Mitchell, A. M., and Mitchell, T. J. (2010).** "Streptococcus Pneumoniae: Virulence Factors and Variation." *Clin Microbiol Infect* **16**, no. 5, 411-8.
- Mitchell, T. J., Andrew, P. W., Saunders, F. K., Smith, A. N., and Boulnois, G. J. (1991).** "Complement Activation and Antibody Binding by Pneumolysin Via a Region of the Toxin Homologous to a Human Acute-Phase Protein." *Mol Microbiol* **5**, no. 8, 1883-8.
- Mizushima, N., and Klionsky, D. J. (2007).** "Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism." *Annu Rev Nutr* **27**, 19-40.

- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001).** "Dissection of Autophagosome Formation Using Apg5-Deficient Mouse Embryonic Stem Cells." *J Cell Biol* **152**, no. 4, 657-68.
- Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007).** "How to Interpret Lc3 Immunoblotting." *Autophagy* **3**, no. 6, 542-5.
- Moazed, T. C., Kuo, C., Grayston, J. T., and Campbell, L. A. (1997).** "Murine Models of Chlamydia Pneumoniae Infection and Atherosclerosis." *J Infect Dis* **175**, no. 4, 883-90.
- Mook-Kanamori, B. B., Geldhoff, M., van der Poll, T., and van de Beek, D. (2011).** "Pathogenesis and Pathophysiology of Pneumococcal Meningitis." *Clin Microbiol Rev* **24**, no. 3, 557-91.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K., and Fauci, A. S. (2008).** "Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness." *J Infect Dis* **198**, no. 7, 962-70.
- Morey, P., Cano, V., Marti-Llitas, P., Lopez-Gomez, A., Regueiro, V., Saus, C., Bengoechea, J. A., and Garmendia, J. (2011).** "Evidence for a Non-Replicative Intracellular Stage of Nontypable Haemophilus Influenzae in Epithelial Cells." *Microbiology* **157**, no. Pt 1, 234-50.
- Morgan, P. J., Hyman, S. C., Rowe, A. J., Mitchell, T. J., Andrew, P. W., and Saibil, H. R. (1995).** "Subunit Organisation and Symmetry of Pore-Forming, Oligomeric Pneumolysin." *FEBS Lett* **371**, no. 1, 77-80.
- Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C., and Morona, R. (2000).** "Tyrosine Phosphorylation of Cpsd Negatively Regulates Capsular Polysaccharide Biosynthesis in Streptococcus Pneumoniae." *Mol Microbiol* **35**, no. 6, 1431-42.
- Morrison, D. A., Trombe, M. C., Hayden, M. K., Waszak, G. A., and Chen, J. D. (1984).** "Isolation of Transformation-Deficient Streptococcus Pneumoniae Mutants Defective in Control of Competence, Using Insertion-Duplication Mutagenesis with the Erythromycin Resistance Determinant of Pam Beta 1." *J Bacteriol* **159**, no. 3, 870-6.
- Mortier-Barriere, I., de Saizieu, A., Claverys, J. P., and Martin, B. (1998).** "Competence-Specific Induction of RecA Is Required for Full Recombination Proficiency During Transformation in Streptococcus Pneumoniae." *Mol Microbiol* **27**, no. 1, 159-70.
- Mostowy, S. (2014).** "Multiple Roles of the Cytoskeleton in Bacterial Autophagy." *PLoS Pathog* **10**, no. 11, e1004409.
- Muller, C., Bang, I. S., Velayudhan, J., Karlinsey, J., Papenfort, K., Vogel, J., and Fang, F. C. (2009).** "Acid Stress Activation of the Sigma(E) Stress Response in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *Mol Microbiol* **71**, no. 5, 1228-38.
- Munz, C. (2011).** "Beclin-1 Targeting for Viral Immune Escape." *Viruses* **3**, no. 7, 1166-78.
- Munz, C. (2014).** "Influenza a Virus Lures Autophagic Protein Lc3 to Budding Sites." *Cell Host Microbe* **15**, no. 2, 130-1.
- Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R., and Kawaoka, Y. (2013).** "Identification of Novel Influenza a Virus Proteins Translated from Pa Mrna." *J Virol* **87**, no. 5, 2455-62.
- Murray, C. J., Lopez, A. D., Chin, B., Feehan, D., and Hill, K. H. (2006).** "Estimation of Potential Global Pandemic Influenza Mortality on the Basis of Vital Registry Data from the 1918-20 Pandemic: A Quantitative Analysis." *Lancet* **368**, no. 9554, 2211-8.
- Muscudere, J., Ofner, M., Kumar, A., Long, J., Lamontagne, F., Cook, D., McGeer, A., et al. (2013).** "The Occurrence and Impact of Bacterial Organisms Complicating Critical Care Illness Associated with 2009 Influenza a(H1n1) Infection." *Chest* **144**, no. 1, 39-47.
- Musher, D. M. (1992).** "Infections Caused by Streptococcus Pneumoniae: Clinical Spectrum, Pathogenesis, Immunity, and Treatment." *Clin Infect Dis* **14**, no. 4, 801-7.
- Mutepe, N. D., Cockeran, R., Steel, H. C., Theron, A. J., Mitchell, T. J., Feldman, C., and Anderson, R. (2013).** "Effects of Cigarette Smoke Condensate on Pneumococcal Biofilm Formation and Pneumolysin." *Eur Respir J* **41**, no. 2, 392-5.

- Mysorekar, I. U., and Hultgren, S. J. (2006).** "Mechanisms of Uropathogenic Escherichia Coli Persistence and Eradication from the Urinary Tract." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, no. 38, 14170-5.
- Nakamura, S., Davis, K. M., and Weiser, J. N. (2011).** "Synergistic Stimulation of Type I Interferons During Influenza Virus Coinfection Promotes Streptococcus Pneumoniae Colonization in Mice." *J Clin Invest* **121**, no. 9, 3657-65.
- Navarre, W. W., and Zychlinsky, A. (2000).** "Pathogen-Induced Apoptosis of Macrophages: A Common End for Different Pathogenic Strategies." *Cell Microbiol* **2**, no. 4, 265-73.
- Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H., and Barman, S. (2009).** "Influenza Virus Morphogenesis and Budding." *Virus Res* **143**, no. 2, 147-61.
- Nayak, D. P., and Hui, E. K. (2004).** "The Role of Lipid Microdomains in Virus Biology." *Subcell Biochem* **37**, 443-91.
- Nelson, A. L., Roche, A. M., Gould, J. M., Chim, K., Ratner, A. J., and Weiser, J. N. (2007).** "Capsule Enhances Pneumococcal Colonization by Limiting Mucus-Mediated Clearance." *Infect Immun* **75**, no. 1, 83-90.
- Nichols, B. J., and Lippincott-Schwartz, J. (2001).** "Endocytosis without Clathrin Coats." *Trends Cell Biol* **11**, no. 10, 406-12.
- Nita-Lazar, M., Banerjee, A., Feng, C., Amin, M. N., Frieman, M. B., Chen, W. H., Cross, A. S., Wang, L. X., and Vasta, G. R. (2015).** "Desialylation of Airway Epithelial Cells During Influenza Virus Infection Enhances Pneumococcal Adhesion Via Galectin Binding." *Mol Immunol* **65**, no. 1, 1-16.
- Nunes, S., Sa-Leao, R., Carrico, J., Alves, C. R., Mato, R., Avo, A. B., Saldanha, J., et al. (2005).** "Trends in Drug Resistance, Serotypes, and Molecular Types of Streptococcus Pneumoniae Colonizing Preschool-Age Children Attending Day Care Centers in Lisbon, Portugal: A Summary of 4 Years of Annual Surveillance." *J Clin Microbiol* **43**, no. 3, 1285-93.
- Nuorti, J. P., Whitney, C. G., Centers for Disease, C., and Prevention. (2010).** "Prevention of Pneumococcal Disease among Infants and Children - Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine - Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (Acip)." *MMWR Recomm Rep* **59**, no. RR-11, 1-18.
- O'Neill, R. E., Talon, J., and Palese, P. (1998).** "The Influenza Virus Np (Ns2 Protein) Mediates the Nuclear Export of Viral Ribonucleoproteins." *EMBO J* **17**, no. 1, 288-96.
- Obenauer, J. C., Denson, J., Mehta, P. K., Su, X., Mukatira, S., Finkelstein, D. B., Xu, X., et al. (2006).** "Large-Scale Sequence Analysis of Avian Influenza Isolates." *Science* **311**, no. 5767, 1576-80.
- Ochs, M. M., Bartlett, W., Briles, D. E., Hicks, B., Jurkuvenas, A., Lau, P., Ren, B., and Millar, A. (2008).** "Vaccine-Induced Human Antibodies to Pspa Augment Complement C3 Deposition on Streptococcus Pneumoniae." *Microb Pathog* **44**, no. 3, 204-14.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. (2005).** "Escape of Intracellular Shigella from Autophagy." *Science* **307**, no. 5710, 727-31.
- Ogunniyi, A. D., Giammarinaro, P., and Paton, J. C. (2002).** "The Genes Encoding Virulence-Associated Proteins and the Capsule of Streptococcus Pneumoniae Are Upregulated and Differentially Expressed in Vivo." *Microbiology* **148**, no. Pt 7, 2045-53.
- Ohsumi, Y. (2001).** "Molecular Dissection of Autophagy: Two Ubiquitin-Like Systems." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, no. 3, 211-6.
- Ong, C. L., Potter, A. J., Trappetti, C., Walker, M. J., Jennings, M. P., Paton, J. C., and McEwan, A. G. (2013).** "Interplay between Manganese and Iron in Pneumococcal Pathogenesis: Role of the Orphan Response Regulator Ritr." *Infect Immun* **81**, no. 2, 421-9.
- Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A. C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R. R., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2004).** "Nucleotide-Binding Oligomerization Domain

- Proteins Are Innate Immune Receptors for Internalized Streptococcus Pneumoniae." *J Biol Chem* **279**, no. 35, 36426-32.
- Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E., Bestebroer, T. M., and Fouchier, R. A. (2000).** "Influenza B Virus in Seals." *Science* **288**, no. 5468, 1051-3.
- Otto, G. P., Wu, M. Y., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O. R., Hilbi, H., Shuman, H. A., and Kessin, R. H. (2004).** "Macroautophagy Is Dispensable for Intracellular Replication of Legionella Pneumophila in Dictyostelium Discoideum." *Mol Microbiol* **51**, no. 1, 63-72.
- Ouellette, S. P., Dorsey, F. C., Moshiach, S., Cleveland, J. L., and Carabeo, R. A. (2011).** "Chlamydia Species-Dependent Differences in the Growth Requirement for Lysosomes." *PLoS One* **6**, no. 3, e16783.
- Ouyang, K., Woodiga, S. A., Dwivedi, V., Buckwalter, C. M., Singh, A. K., Binjawadagi, B., Hiremath, J., et al. (2014).** "Pretreatment of Epithelial Cells with Live Streptococcus Pneumoniae Has No Detectable Effect on Influenza a Virus Replication in Vitro." *PLoS One* **9**, no. 3, e90066.
- Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., and Compans, R. W. (1974).** "Characterization of Temperature Sensitive Influenza Virus Mutants Defective in Neuraminidase." *Virology* **61**, no. 2, 397-410.
- Pareja, M. E., and Colombo, M. I. (2013).** "Autophagic Clearance of Bacterial Pathogens: Molecular Recognition of Intracellular Microorganisms." *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 54.
- Parker, D., Martin, F. J., Soong, G., Harfenist, B. S., Aguilar, J. L., Ratner, A. J., Fitzgerald, K. A., Schindler, C., and Prince, A. (2011).** "Streptococcus Pneumoniae DNA Initiates Type I Interferon Signaling in the Respiratory Tract." *MBio* **2**, no. 3, e00016-11.
- Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A. J., and Prince, A. (2009).** "The Nana Neuraminidase of Streptococcus Pneumoniae Is Involved in Biofilm Formation." *Infect Immun* **77**, no. 9, 3722-30.
- Patenge, N., Fiedler, T., and Kreikemeyer, B. (2013).** "Common Regulators of Virulence in Streptococci." *Curr Top Microbiol Immunol* **368**, 111-53.
- Paterson, G. K., Blue, C. E., and Mitchell, T. J. (2006).** "Role of Two-Component Systems in the Virulence of Streptococcus Pneumoniae." *J Med Microbiol* **55**, no. Pt 4, 355-63.
- Pei, J., Kahl-McDonagh, M., and Ficht, T. A. (2014).** "Brucella Dissociation Is Essential for Macrophage Egress and Bacterial Dissemination." *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 23.
- Pelkmans, L., and Helenius, A. (2003).** "Insider Information: What Viruses Tell Us About Endocytosis." *Curr Opin Cell Biol* **15**, no. 4, 414-22.
- Peltola, V. T., and McCullers, J. A. (2004).** "Respiratory Viruses Predisposing to Bacterial Infections: Role of Neuraminidase." *Pediatr Infect Dis J* **23**, no. 1 Suppl, S87-97.
- Perez-Boto, D., Garcia-Pena, F. J., Abad-Moreno, J. C., and Echeita, M. A. (2012).** "Dynamics of Populations of Campylobacter Jejuni in Two Grandparent Broiler Breeder Farms: Persistent Vs. Transient Strains." *Vet Microbiol* **159**, no. 1-2, 204-11.
- Perez-Dorado, I., Gonzalez, A., Morales, M., Sanles, R., Striker, W., Vollmer, W., Mobashery, S., et al. (2010).** "Insights into Pneumococcal Fratricide from the Crystal Structures of the Modular Killing Factor Lytc." *Nat Struct Mol Biol* **17**, no. 5, 576-81.
- Pesakhov, S., Benisty, R., Sikron, N., Cohen, Z., Gomelsky, P., Khozin-Goldberg, I., Dagan, R., and Porat, N. (2007).** "Effect of Hydrogen Peroxide Production and the Fenton Reaction on Membrane Composition of Streptococcus Pneumoniae." *Biochim Biophys Acta* **1768**, no. 3, 590-7.
- Pestova, E. V., Havarstein, L. S., and Morrison, D. A. (1996).** "Regulation of Competence for Genetic Transformation in Streptococcus Pneumoniae by an Auto-Induced Peptide Pheromone and a Two-Component Regulatory System." *Mol Microbiol* **21**, no. 4, 853-62.
- Pinas, G. E., Cortes, P. R., Orio, A. G., and Echenique, J. (2008).** "Acidic Stress Induces Autolysis by a Csp-Independent Come Pathway in Streptococcus Pneumoniae." *Microbiology* **154**, no. Pt 5, 1300-8.

- Pinto, L. H., and Lamb, R. A. (2006).** "Influenza Virus Proton Channels." *Photochem Photobiol Sci* **5**, no. 6, 629-32.
- Pinto, L. H., and Lamb, R. A. (2006).** "The M2 Proton Channels of Influenza a and B Viruses." *J Biol Chem* **281**, no. 14, 8997-9000.
- Pittet, L. A., Hall-Stoodley, L., Rutkowski, M. R., and Harmsen, A. G. (2010).** "Influenza Virus Infection Decreases Tracheal Mucociliary Velocity and Clearance of Streptococcus Pneumoniae." *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, no. 4, 450-60.
- Pizarro-Cerda, J., Bonazzi, M., and Cossart, P. (2010).** "Clathrin-Mediated Endocytosis: What Works for Small, Also Works for Big." *Bioessays* **32**, no. 6, 496-504.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R. G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E., and Gorvel, J. P. (1998).** "Brucella Abortus Transits through the Autophagic Pathway and Replicates in the Endoplasmic Reticulum of Nonprofessional Phagocytes." *Infect Immun* **66**, no. 12, 5711-24.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., and Krug, R. M. (1979).** "Transfer of 5'-Terminal Cap of Globin Mrna to Influenza Viral Complementary Rna During Transcription in Vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, no. 4, 1618-22.
- Plotkowski, M. C., Puchelle, E., Beck, G., Jacquot, J., and Hannoun, C. (1986).** "Adherence of Type I Streptococcus Pneumoniae to Tracheal Epithelium of Mice Infected with Influenza a/Pr8 Virus." *Am Rev Respir Dis* **134**, no. 5, 1040-4.
- Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L., and Simon, D. (1998).** "Large-Scale Identification of Virulence Genes from Streptococcus Pneumoniae." *Infect Immun* **66**, no. 12, 5620-9.
- Predescu, D., Vogel, S. M., and Malik, A. B. (2004).** "Functional and Morphological Studies of Protein Transcytosis in Continuous Endothelia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, no. 5, L895-901.
- Preston, J. A., and Dockrell, D. H. (2008).** "Virulence Factors in Pneumococcal Respiratory Pathogenesis." *Future Microbiol* **3**, no. 2, 205-21.
- Price, K. E., and Camilli, A. (2009).** "Pneumolysin Localizes to the Cell Wall of Streptococcus Pneumoniae." *J Bacteriol* **191**, no. 7, 2163-8.
- Price, K. E., Greene, N. G., and Camilli, A. (2012).** "Export Requirements of Pneumolysin in Streptococcus Pneumoniae." *J Bacteriol* **194**, no. 14, 3651-60.
- Pullianen, A. T., Haataja, S., Kahkonen, S., and Finne, J. (2003).** "Molecular Basis of H₂O₂ Resistance Mediated by Streptococcal Dpr. Demonstration of the Functional Involvement of the Putative Ferroxidase Center by Site-Directed Mutagenesis in Streptococcus Suis." *J Biol Chem* **278**, no. 10, 7996-8005.
- Qa'Dan, M., Spyres, L. M., and Ballard, J. D. (2000).** "Ph-Induced Conformational Changes in Clostridium Difficile Toxin B." *Infect Immun* **68**, no. 5, 2470-4.
- Radin, J. N., Orihuela, C. J., Murti, G., Guglielmo, C., Murray, P. J., and Tuomanen, E. I. (2005).** "Beta-Arrestin 1 Participates in Platelet-Activating Factor Receptor-Mediated Endocytosis of Streptococcus Pneumoniae." *Infect Immun* **73**, no. 12, 7827-35.
- Raff, A. B., Woodham, A. W., Raff, L. M., Skeate, J. G., Yan, L., Da Silva, D. M., Schelhaas, M., and Kast, W. M. (2013).** "The Evolving Field of Human Papillomavirus Receptor Research: A Review of Binding and Entry." *J Virol* **87**, no. 11, 6062-72.
- Ramos-Sevillano, E., Moscoso, M., Garcia, P., Garcia, E., and Yuste, J. (2011).** "Nasopharyngeal Colonization and Invasive Disease Are Enhanced by the Cell Wall Hydrolases LytB and LytC of Streptococcus Pneumoniae." *PLoS One* **6**, no. 8, e23626.
- Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., Campuzano, S., Moscoso, M., Gonzalez-Camacho, F., Domenech, M., Rodriguez de Cordoba, S., et al. (2015).** "Pleiotropic Effects of Cell Wall Amidase LytA on Streptococcus Pneumoniae Sensitivity to the Host Immune Response." *Infect Immun* **83**, no. 2, 591-603.

- Ran, Z., Shen, H., Lang, Y., Kolb, E. A., Turan, N., Zhu, L., Ma, J., *et al.* (2015). "Domestic Pigs Are Susceptible to Infection with Influenza B Viruses." *J Virol* **89**, no. 9, 4818-26.
- Rawadi, G., and Dussurget, O. (1995). "Advances in Pcr-Based Detection of Mycoplasmas Contaminating Cell Cultures." *PCR Methods Appl* **4**, no. 4, 199-208.
- Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y. (1998). "Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, no. 4, 1094-156.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho Proteins, Pi 3-Kinases, and Monocyte/Macrophage Motility." *FEBS Lett* **498**, no. 2-3, 168-71.
- Rijneveld, A. W., Weijer, S., Florquin, S., Speelman, P., Shimizu, T., Ishii, S., and van der Poll, T. (2004). "Improved Host Defense against Pneumococcal Pneumonia in Platelet-Activating Factor Receptor-Deficient Mice." *J Infect Dis* **189**, no. 4, 711-6.
- Ring, A., Weiser, J. N., and Tuomanen, E. I. (1998). "Pneumococcal Trafficking across the Blood-Brain Barrier. Molecular Analysis of a Novel Bidirectional Pathway." *J Clin Invest* **102**, no. 2, 347-60.
- Ritter, J. B., Wahl, A. S., Freund, S., Genzel, Y., and Reichl, U. (2010). "Metabolic Effects of Influenza Virus Infection in Cultured Animal Cells: Intra- and Extracellular Metabolite Profiling." *BMC Syst Biol* **4**, 61.
- Rodriguez, N. E., Gaur, U., and Wilson, M. E. (2006). "Role of Caveolae in Leishmania Chagasi Phagocytosis and Intracellular Survival in Macrophages." *Cell Microbiol* **8**, no. 7, 1106-20.
- Roe, B., Kensicki, E., Mohney, R., and Hall, W. W. (2011). "Metabolomic Profile of Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes." *PLoS One* **6**, no. 8, e23641.
- Rohde, M., Muller, E., Chhatwal, G. S., and Talay, S. R. (2003). "Host Cell Caveolae Act as an Entry-Port for Group a Streptococci." *Cell Microbiol* **5**, no. 5, 323-42.
- Rosch, J. W., Mann, B., Thornton, J., Sublett, J., and Tuomanen, E. (2008). "Convergence of Regulatory Networks on the Pilus Locus of Streptococcus Pneumoniae." *Infect Immun* **76**, no. 7, 3187-96.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., and Masure, H. R. (1997). "Contribution of Novel Choline-Binding Proteins to Adherence, Colonization and Immunogenicity of Streptococcus Pneumoniae." *Mol Microbiol* **25**, no. 5, 819-29.
- Rossman, J. S., and Lamb, R. A. (2011). "Influenza Virus Assembly and Budding." *Virology* **411**, no. 2, 229-36.
- Rothberg, M. B., and Haessler, S. D. (2010). "Complications of Seasonal and Pandemic Influenza." *Crit Care Med* **38**, no. 4 Suppl, e91-7.
- Russell, M. R., Nickerson, D. P., and Odorizzi, G. (2006). "Molecular Mechanisms of Late Endosome Morphology, Identity and Sorting." *Curr Opin Cell Biol* **18**, no. 4, 422-8.
- Sambrook, J., Fritsch F., and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition.* 1989.
- Sanders, M. E., Norcross, E. W., Robertson, Z. M., Moore, Q. C., 3rd, Fratkin, J., and Marquart, M. E. (2011). "The Streptococcus Pneumoniae Capsule Is Required for Full Virulence in Pneumococcal Endophthalmitis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, no. 2, 865-72.
- Sanjuan, M. A., and Green, D. R. (2008). "Eating for Good Health: Linking Autophagy and Phagocytosis in Host Defense." *Autophagy* **4**, no. 5, 607-11.
- Sarkar, S., Ravikumar, B., Floto, R. A., and Rubinsztein, D. C. (2009). "Rapamycin and Mtor-Independent Autophagy Inducers Ameliorate Toxicity of Polyglutamine-Expanded Huntingtin and Related Proteinopathies." *Cell Death Differ* **16**, no. 1, 46-56.
- Scott, C. C., Vacca, F., and Gruenberg, J. (2014). "Endosome Maturation, Transport and Functions." *Semin Cell Dev Biol* **31**, 2-10.
- Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T., and Simons, K. (1999). "Influenza Viruses Select Ordered Lipid Domains During Budding from the Plasma Membrane." *J Biol Chem* **274**, no. 4, 2038-44.

- Scholtissek, C., von Hoyningen, V., and Rott, R. (1978).** "Genetic Relatedness between the New 1977 Epidemic Strains (H1n1) of Influenza and Human Influenza Strains Isolated between 1947 and 1957 (H1n1)." *Virology* **89**, no. 2, 613-7.
- Schrauwen, E. J., de Graaf, M., Herfst, S., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D., and Fouchier, R. A. (2014).** "Determinants of Virulence of Influenza A Virus." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**, no. 4, 479-90.
- Schwartz, D. J., Chen, S. L., Hultgren, S. J., and Seed, P. C. (2011).** "Population Dynamics and Niche Distribution of Uropathogenic Escherichia Coli During Acute and Chronic Urinary Tract Infection." *Infect Immun* **79**, no. 10, 4250-9.
- Sebert, M. E., Patel, K. P., Plotnick, M., and Weiser, J. N. (2005).** "Pneumococcal Htra Protease Mediates Inhibition of Competence by the Ciarh Two-Component Signaling System." *J Bacteriol* **187**, no. 12, 3969-79.
- Seki, M., Kosai, K., Hara, A., Imamura, Y., Nakamura, S., Kurihara, S., Izumikawa, K., et al. (2009).** "Expression and DNA Microarray Analysis of a Platelet Activating Factor-Related Molecule in Severe Pneumonia in Mice Due to Influenza Virus and Bacterial Co-Infection." *Jpn J Infect Dis* **62**, no. 1, 6-10.
- Severi, E., Hood, D. W., and Thomas, G. H. (2007).** "Sialic Acid Utilization by Bacterial Pathogens." *Microbiology* **153**, no. Pt 9, 2817-22.
- Shahangian, A., Chow, E. K., Tian, X., Kang, J. R., Ghaffari, A., Liu, S. Y., Belperio, J. A., Cheng, G., and Deng, J. C. (2009).** "Type I Ifns Mediate Development of Postinfluenza Bacterial Pneumonia in Mice." *J Clin Invest* **119**, no. 7, 1910-20.
- Shope, R. E. (1931).** "Swine Influenza : Iii. Filtration Experiments and Etiology." *J Exp Med* **54**, no. 3, 373-85.
- Short, K. R., Diavatopoulos, D. A., Reading, P. C., Brown, L. E., Rogers, K. L., Strugnell, R. A., and Wijburg, O. L. (2011).** "Using Bioluminescent Imaging to Investigate Synergism between Streptococcus Pneumoniae and Influenza A Virus in Infant Mice." *J Vis Exp*, no. 50.
- Short, K. R., Habets, M. N., Hermans, P. W., and Diavatopoulos, D. A. (2012).** "Interactions between Streptococcus Pneumoniae and Influenza Virus: A Mutually Beneficial Relationship?" *Future Microbiol* **7**, no. 5, 609-24.
- Sieczkarski, S. B., and Whittaker, G. R. (2005).** "Characterization of the Host Cell Entry of Filamentous Influenza Virus." *Arch Virol* **150**, no. 9, 1783-96.
- Siegel, S. J., Roche, A. M., and Weiser, J. N. (2014).** "Influenza Promotes Pneumococcal Growth During Coinfection by Providing Host Sialylated Substrates as a Nutrient Source." *Cell Host Microbe* **16**, no. 1, 55-67.
- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. (2012).** "Phagosomal Rupture by Mycobacterium Tuberculosis Results in Toxicity and Host Cell Death." *PLoS Pathog* **8**, no. 2, e1002507.
- Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (2000).** "Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin." *Annu Rev Biochem* **69**, 531-69.
- Small, C. L., Shaler, C. R., McCormick, S., Jeyanathan, M., Damjanovic, D., Brown, E. G., Arck, P., et al. (2010).** "Influenza Infection Leads to Increased Susceptibility to Subsequent Bacterial Superinfection by Impairing Nk Cell Responses in the Lung." *J Immunol* **184**, no. 4, 2048-56.
- Smith, A. M., and McCullers, J. A. (2014).** "Secondary Bacterial Infections in Influenza Virus Infection Pathogenesis." *Curr Top Microbiol Immunol* **385**, 327-56.
- Smith, G. J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., Pybus, O. G., Ma, S. K., et al. (2009).** "Origins and Evolutionary Genomics of the 2009 Swine-Origin H1n1 Influenza A Epidemic." *Nature* **459**, no. 7250, 1122-5.
- Standish, A. J., Stroehner, U. H., and Paton, J. C. (2007).** "The Pneumococcal Two-Component Signal Transduction System Rr/Hk06 Regulates Cbpa and Pspa by Two Distinct Mechanisms." *J Bacteriol* **189**, no. 15, 5591-600.

- Standish, A. J., and Weiser, J. N. (2009).** "Human Neutrophils Kill Streptococcus Pneumoniae Via Serine Proteases." *J Immunol* **183**, no. 4, 2602-9.
- Stegmann, T. (2000).** "Membrane Fusion Mechanisms: The Influenza Hemagglutinin Paradigm and Its Implications for Intracellular Fusion." *Traffic* **1**, no. 8, 598-604.
- Steinhauer, D. A., and Skehel, J. J. (2002).** "Genetics of Influenza Viruses." *Annu Rev Genet* **36**, 305-32.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000).** "Two-Component Signal Transduction." *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215.
- Stohr, K. (2003).** "Preventing and Treating Influenza." *Bmj* **326**, no. 7401, 1223-4.
- Sun, K., and Metzger, D. W. (2008).** "Inhibition of Pulmonary Antibacterial Defense by Interferon-Gamma During Recovery from Influenza Infection." *Nat Med* **14**, no. 5, 558-64.
- Sun, X., and Whittaker, G. R. (2013).** "Entry of Influenza Virus." *Adv Exp Med Biol* **790**, 72-82.
- Suzuki, Y. (2005).** "Sialobiology of Influenza: Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses." *Biol Pharm Bull* **28**, no. 3, 399-408.
- Szewczyk, B., Bienkowska-Szewczyk, K., and Krol, E. (2014).** "Introduction to Molecular Biology of Influenza a Viruses." *Acta Biochim Pol* **61**, no. 3, 397-401.
- Takeuchi, H., Furuta, N., Morisaki, I., and Amano, A. (2011).** "Exit of Intracellular Porphyromonas Gingivalis from Gingival Epithelial Cells Is Mediated by Endocytic Recycling Pathway." *Cell Microbiol* **13**, no. 5, 677-91.
- Talbot, U. M., Paton, A. W., and Paton, J. C. (1996).** "Uptake of Streptococcus Pneumoniae by Respiratory Epithelial Cells." *Infect Immun* **64**, no. 9, 3772-7.
- Taubenberger, J. K., and Morens, D. M. (2008).** "The Pathology of Influenza Virus Infections." *Annu Rev Pathol* **3**, 499-522.
- Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P., Ingraham, K. A., Chalker, A. F., Ge, Y., Marra, A., et al. (2000).** "A Genomic Analysis of Two-Component Signal Transduction in Streptococcus Pneumoniae." *Mol Microbiol* **35**, no. 3, 566-76.
- Timenetsky, J., Santos, L. M., Buzinhani, M., and Mettifogo, E. (2006).** "Detection of Multiple Mycoplasma Infection in Cell Cultures by Pcr." *Braz J Med Biol Res* **39**, no. 7, 907-14.
- Tomasz, A. (1997).** "Antibiotic Resistance in Streptococcus Pneumoniae." *Clin Infect Dis* **24 Suppl 1**, S85-8.
- Tong, H. H., Fisher, L. M., Kosunick, G. M., and Demaria, T. F. (1999).** "Effect of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 1-Alpha on the Adherence of Streptococcus Pneumoniae to Chinchilla Tracheal Epithelium." *Acta Otolaryngol* **119**, no. 1, 78-82.
- Tong, H. H., Weiser, J. N., James, M. A., and DeMaria, T. F. (2001).** "Effect of Influenza a Virus Infection on Nasopharyngeal Colonization and Otitis Media Induced by Transparent or Opaque Phenotype Variants of Streptococcus Pneumoniae in the Chinchilla Model." *Infect Immun* **69**, no. 1, 602-6.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979).** "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, no. 9, 4350-4.
- Trappetti, C., Potter, A. J., Paton, A. W., Oggioni, M. R., and Paton, J. C. (2011).** "LuxS Mediates Iron-Dependent Biofilm Formation, Competence, and Fratricide in Streptococcus Pneumoniae." *Infect Immun* **79**, no. 11, 4550-8.
- Tugizov, S. M., Herrera, R., and Palefsky, J. M. (2013).** "Epstein-Barr Virus Transcytosis through Polarized Oral Epithelial Cells." *J Virol* **87**, no. 14, 8179-94.
- Tumpey, T. M., Garcia-Sastre, A., Taubenberger, J. K., Palese, P., Swayne, D. E., Pantin-Jackwood, M. J., Schultz-Cherry, S., et al. (2005).** "Pathogenicity of Influenza Viruses with Genes from the 1918 Pandemic Virus: Functional Roles of Alveolar Macrophages and Neutrophils in Limiting Virus Replication and Mortality in Mice." *J Virol* **79**, no. 23, 14933-44.
- Tuomanen, E. I., Austrian, R., and Masure, H. R. (1995).** "Pathogenesis of Pneumococcal Infection." *N Engl J Med* **332**, no. 19, 1280-4.

- Ueno, N., Bratt, C. L., Rodriguez, N. E., and Wilson, M. E. (2009).** "Differences in Human Macrophage Receptor Usage, Lysosomal Fusion Kinetics and Survival between Logarithmic and Metacyclic *Leishmania Infantum* Chagasi Promastigotes." *Cell Microbiol* **11**, no. 12, 1827-41.
- Ulijasz, A. T., Andes, D. R., Glasner, J. D., and Weisblum, B. (2004).** "Regulation of Iron Transport in *Streptococcus Pneumoniae* by RitR, an Orphan Response Regulator." *J Bacteriol* **186**, no. 23, 8123-36.
- Ulijasz, A. T., Falk, S. P., and Weisblum, B. (2009).** "Phosphorylation of the RitR DNA-Binding Domain by a Ser-Thr Phosphokinase: Implications for Global Gene Regulation in the *Streptococci*." *Mol Microbiol* **71**, no. 2, 382-90.
- Uphoff, C. C., and Drexler, H. G. (2014).** "Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures." *Curr Protoc Mol Biol* **106**, 28.4.1-28.4.14.
- Uphoff, C. C., Meyer, C., and Drexler, H. G. (2002).** "Elimination of Mycoplasma from Leukemia-Lymphoma Cell Lines Using Antibiotics." *Leukemia* **16**, no. 2, 284-8.
- Vadia, S., Arnett, E., Haghghat, A. C., Wilson-Kubalek, E. M., Tweten, R. K., and Seveau, S. (2011).** "The Pore-Forming Toxin Listeriolysin O Mediates a Novel Entry Pathway of *L. Monocytogenes* into Human Hepatocytes." *PLoS Pathog* **7**, no. 11, e1002356.
- van de Rijn, I., and Kessler, R. E. (1980).** "Growth Characteristics of Group A Streptococci in a New Chemically Defined Medium." *Infect Immun* **27**, no. 2, 444-8.
- van der Goot, F. G., and Gruenberg, J. (2006).** "Intra-Endosomal Membrane Traffic." *Trends Cell Biol* **16**, no. 10, 514-21.
- van der Poll, T., and Opal, S. M. (2009).** "Pathogenesis, Treatment, and Prevention of Pneumococcal Pneumonia." *Lancet* **374**, no. 9700, 1543-56.
- van der Sluijs, K. F., van Elden, L. J., Nijhuis, M., Schuurman, R., Florquin, S., Shimizu, T., Ishii, S., et al. (2006).** "Involvement of the Platelet-Activating Factor Receptor in Host Defense against *Streptococcus Pneumoniae* During Postinfluenza Pneumonia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, no. 1, L194-9.
- van Kuppeveld, F. J., Johansson, K. E., Galama, J. M., Kissing, J., Bolske, G., van der Logt, J. T., and Melchers, W. J. (1994).** "Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by a Mycoplasma Group-Specific Pcr." *Appl Environ Microbiol* **60**, no. 1, 149-52.
- Varon, E. (2012).** "Epidemiology of *Streptococcus Pneumoniae*." *Med Mal Infect* **42**, no. 8, 361-5.
- Vazquez, C. L., and Colombo, M. I. (2010).** "Coxiella Burnetii Modulates Beclin 1 and Bcl-2, Preventing Host Cell Apoptosis to Generate a Persistent Bacterial Infection." *Cell Death Differ* **17**, no. 3, 421-38.
- Veiga, E., and Cossart, P. (2005).** "Listeria Hijacks the Clathrin-Dependent Endocytic Machinery to Invade Mammalian Cells." *Nat Cell Biol* **7**, no. 9, 894-900.
- Veiga, E., Guttman, J. A., Bonazzi, M., Boucrot, E., Toledo-Arana, A., Lin, A. E., Enninga, J., et al. (2007).** "Invasive and Adherent Bacterial Pathogens Co-Opt Host Clathrin for Infection." *Cell Host Microbe* **2**, no. 5, 340-51.
- Wang, J., Qiu, J. X., Soto, C., and DeGrado, W. F. (2011).** "Structural and Dynamic Mechanisms for the Function and Inhibition of the M2 Proton Channel from Influenza A Virus." *Curr Opin Struct Biol* **21**, no. 1, 68-80.
- Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2007).** "Capsule and D-Alanylated Lipoteichoic Acids Protect *Streptococcus Pneumoniae* against Neutrophil Extracellular Traps." *Cell Microbiol* **9**, no. 5, 1162-71.
- Watson, R. O., and Galan, J. E. (2008).** "Campylobacter Jejuni Survives within Epithelial Cells by Avoiding Delivery to Lysosomes." *PLoS Pathog* **4**, no. 1, e14.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., and Kawaoka, Y. (1992).** "Evolution and Ecology of Influenza A Viruses." *Microbiol Rev* **56**, no. 1, 152-79.
- Weiser, J. N., Markiewicz, Z., Tuomanen, E. I., and Wani, J. H. (1996).** "Relationship between Phase Variation in Colony Morphology, Intrastrain Variation in Cell Wall Physiology, and

- Nasopharyngeal Colonization by Streptococcus Pneumoniae." *Infect Immun* **64**, no. 6, 2240-5.
- Welchman, R. L., Gordon, C., and Mayer, R. J. (2005).** "Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins as Multifunctional Signals." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, no. 8, 599-609.
- Wilks, S., de Graaf, M., Smith, D. J., and Burke, D. F. (2012).** "A Review of Influenza Haemagglutinin Receptor Binding as It Relates to Pandemic Properties." *Vaccine* **30**, no. 29, 4369-76.
- Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E. C., Barclay, W. S., and Digard, P. (2009).** "A Complicated Message: Identification of a Novel Pb1-Related Protein Translated from Influenza a Virus Segment 2 Mrna." *J Virol* **83**, no. 16, 8021-31.
- Wolf, A. I., Strauman, M. C., Mozdzanowska, K., Whittle, J. R., Williams, K. L., Sharpe, A. H., Weiser, J. N., et al. (2014).** "Coinfection with Streptococcus Pneumoniae Modulates the B Cell Response to Influenza Virus." *J Virol* **88**, no. 20, 11995-2005.
- Wolf, A. I., Strauman, M. C., Mozdzanowska, K., Williams, K. L., Osborne, L. C., Shen, H., Liu, Q., et al. (2014).** "Pneumolysin Expression by Streptococcus Pneumoniae Protects Colonized Mice from Influenza Virus-Induced Disease." *Virology* **462-463**, 254-65.
- Wu, Y., Mao, H., Ling, M. T., Chow, K. H., Ho, P. L., Tu, W., and Lau, Y. L. (2011).** "Successive Influenza Virus Infection and Streptococcus Pneumoniae Stimulation Alter Human Dendritic Cell Function." *BMC Infect Dis* **11**, 201.
- Wu, Y., Tu, W., Lam, K. T., Chow, K. H., Ho, P. L., Guan, Y., Peiris, J. S., and Lau, Y. L. (2015).** "Lethal Coinfection of Influenza Virus and Streptococcus Pneumoniae Lowers Antibody Response to Influenza Virus in Lung and Reduces Numbers of Germinal Center B Cells, T Follicular Helper Cells, and Plasma Cells in Mediastinal Lymph Node." *J Virol* **89**, no. 4, 2013-23.
- Wu, Y., and Voth, G. A. (2003).** "Computational Studies of Proton Transport through the M2 Channel." *FEBS Lett* **552**, no. 1, 23-7.
- Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., and Gao, G. F. (2014).** "Bat-Derived Influenza-Like Viruses H17n10 and H18n11." *Trends Microbiol* **22**, no. 4, 183-91.
- Yamada, H., Chounan, R., Higashi, Y., Kurihara, N., and Kido, H. (2004).** "Mitochondrial Targeting Sequence of the Influenza a Virus Pb1-F2 Protein and Its Function in Mitochondria." *FEBS Lett* **578**, no. 3, 331-6.
- Yesilkaya, H., Manco, S., Kadioglu, A., Terra, V. S., and Andrew, P. W. (2008).** "The Ability to Utilize Mucin Affects the Regulation of Virulence Gene Expression in Streptococcus Pneumoniae." *FEMS Microbiol Lett* **278**, no. 2, 231-5.
- Yokota, S., Okabayashi, T., Yoto, Y., Hori, T., Tsutsumi, H., and Fujii, N. (2010).** "Fosfomycin Suppresses Rs-Virus-Induced Streptococcus Pneumoniae and Haemophilus Influenzae Adhesion to Respiratory Epithelial Cells Via the Platelet-Activating Factor Receptor." *FEMS Microbiol Lett* **310**, no. 1, 84-90.
- Yondola, M. A., Fernandes, F., Belicha-Villanueva, A., Uccellini, M., Gao, Q., Carter, C., and Palese, P. (2011).** "Budding Capability of the Influenza Virus Neuraminidase Can Be Modulated by Tetherin." *J Virol* **85**, no. 6, 2480-91.
- Yoon, S. W., Webby, R. J., and Webster, R. G. (2014).** "Evolution and Ecology of Influenza a Viruses." *Curr Top Microbiol Immunol* **385**, 359-75.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Chakraborty, T., and Sasakawa, C. (2009).** "Listeria Monocytogenes Acta Is a Key Player in Evading Autophagic Recognition." *Autophagy* **5**, no. 8, 1220-1.
- Yother, J. (2011).** "Capsules of Streptococcus Pneumoniae and Other Bacteria: Paradigms for Polysaccharide Biosynthesis and Regulation." *Annu Rev Microbiol* **65**, 563-81.
- Yuste, J., Khandavilli, S., Ansari, N., Muttardi, K., Ismail, L., Hyams, C., Weiser, J., Mitchell, T., and Brown, J. S. (2010).** "The Effects of Pspc on Complement-Mediated Immunity to Streptococcus Pneumoniae Vary with Strain Background and Capsular Serotype." *Infect Immun* **78**, no. 1, 283-92.

- Zahner, D., Kaminski, K., van der Linden, M., Mascher, T., Meral, M., and Hakenbeck, R. (2002).** "The Ciar/Ciah Regulatory Network of *Streptococcus Pneumoniae*." *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, no. 3, 211-6.
- Zamarin, D., Ortigoza, M. B., and Palese, P. (2006).** "Influenza a Virus Pb1-F2 Protein Contributes to Viral Pathogenesis in Mice." *J Virol* **80**, no. 16, 7976-83.
- Zhang, J., Pekosz, A., and Lamb, R. A. (2000).** "Influenza Virus Assembly and Lipid Raft Microdomains: A Role for the Cytoplasmic Tails of the Spike Glycoproteins." *J Virol* **74**, no. 10, 4634-44.
- Zhang, J. R., Mostov, K. E., Lamm, M. E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M., and Tuomanen, E. (2000).** "The Polymeric Immunoglobulin Receptor Translocates Pneumococci across Human Nasopharyngeal Epithelial Cells." *Cell* **102**, no. 6, 827-37.
- Zhirnov, O. P., and Klenk, H. D. (2013).** "Influenza a Virus Proteins Ns1 and Hemagglutinin Along with M2 Are Involved in Stimulation of Autophagy in Infected Cells." *J Virol* **87**, no. 24, 13107-14.
- Zhou, Z., Jiang, X., Liu, D., Fan, Z., Hu, X., Yan, J., Wang, M., and Gao, G. F. (2009).** "Autophagy Is Involved in Influenza a Virus Replication." *Autophagy* **5**, no. 3, 321-8.