



Universidad Pública de Navarra

Departamento de Producción Agraria

Instituto de Agrobiotecnología

Estudio de las bases moleculares de la infección respiratoria por el patógeno bacteriano *Haemophilus influenzae*: efecto de la auxotrofia metabólica e implementación de un nuevo modelo experimental preclínico

Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor, presentada por:

Irene Rodríguez Arce

Directora: Dra. Junkal Garmendia García

Tutora: Inmaculada Farrán Blanch

Pamplona, 2018

La Dra. Junkal Garmendia García, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), adscrita al grupo de Sanidad Animal del Instituto de Agrobiotecnología,

INFORMA,

Que la presente memoria de Tesis Doctoral “Estudio de las bases moleculares de la infección respiratoria por el patógeno bacteriano *Haemophilus influenzae*: efecto de la auxotrofia metabólica e implementación de un nuevo modelo experimental preclínico” elaborada por Irene Rodríguez Arce bajo su dirección, cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma la presente en Pamplona/Iruña, a 20 de Septiembre de 2018.

Fdo. Junkal Garmendia García

Este trabajo se ha desarrollado mediante el disfrute de un contrato de Formación de Personal Investigador de la Universidad Pública de Navarra por parte de Irene Rodríguez Arce, adscrito a los proyectos SAF2012-31166 (junio 2014-diciembre 2015), SAF2015-66520-R (enero 2016-junio 2018), y Departamento de Salud Gobierno de Navarra proyecto 3/2016 (diciembre 2016-junio 2018), concedidos a la Dra. Junkal Garmendia García.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer el apoyo prestado por las instituciones y entidades que con su inversión, han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral; especialmente, a la Universidad Pública de Navarra por la concesión de la beca predoctoral. A mi Directora, la Dra. Junkal Garmendia, por la posibilidad de incorporarme a su grupo de investigación durante estos cuatro años; a mi Tutora Inma Farrán, por haber sido tan accesible y dispuesta siempre que la he necesitado, a pesar de ser del equipo de fútbol equivocado; y a todas las personas que han colaborado en el desarrollo de este trabajo: Sara Martí (Hospital Universitario de Bellvitge), José Leiva (Clínica Universitaria de Navarra), José Yuste (Instituto de Salud Carlos III), José Ramos-Vivas (Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla), Montserrat Barberán (Universidad de Zaragoza), Kristian Riesbeck y Tamim Al Jubair (Universidad de Lund), Derek Hood (MRC Harwell Institute), Jeroen Langereis (Radboud University Medical Center) y Carlos Ortiz de Solórzano (Centro de Investigación Médica Aplicada).

Gracias también al resto de personas que conforman el Instituto de Agrobiotecnología-CSIC. Gracias al equipo de gerencia del CSIC y la UPNa, y a sus sonrisas y humanidad; a Víctor y su manía de cerrar la puerta con bromas horribles; a Goi, por sus ánimos y ayuda, pero sobre todo por nuestras conversaciones en los pasillos a cualquier hora del día. A Ángela, por su compañía en los cigarros de 2 minutos y los sanfermines compartidos; a Paco, por las risas después de sus siestas y por haberme ayudado siempre que lo he necesitado y a Abdel, por despejarme la cabeza los fines de semana, por sus consejos, sus conversaciones y su buen humor. A Lorena y Saio, por abrirme las puertas, por los cines, las cervezas, las compras, las copas y las risas compartidas. A Ana y Vicky, gracias por los constantes ánimos y las conversaciones en los pasillos o en el animalario. A Ohiane, por su claridad, transparencia, su cabeza loca y centrada al mismo tiempo, y su cariño y complicidad en tantos momentos. Y a vosotros, Ale y Damián, gracias simplemente por demostrarme que ser jefe no está reñido con ser grandes personas. Gracias a todos los que nombro y a los que no, porque todos habéis sido en algún momento esa persona que me ha sacado una sonrisa a lo largo de este tiempo. Gracias a Xabi por los buenos momentos

durante las horas encerrados en el animalario del CIMA, por los memes en los ratos muertos. Y a ti Leire, rata sarnosa apestosa, por haber marcado mi estancia en Madrid, por las horas de citómetro, por todas las risas compartidas, por esas llamadas pendientes y ese viaje a Utrecht que haré para que me cuentes tus (ya no) penas. Y después de tu intervención en estos agradecimientos, también a tu preciosa Bilbao.

Gracias a las personas con las que he compartido el laboratorio 4, independientemente del lado de la línea roja donde se encontraran. Cris Viadas, Raquel, Bea y Ale, gracias por compartir vuestra experiencia, por vuestra paciencia, y simplemente estar y hacerme ver que todo tenía un final. A Javierci, por esas manos (y qué manos), por las risas, por las conversaciones que “elevaban” el nivel “intelectual”, por ser tan irremediabilmente idiota; y a Pedro, sólo por el wifi compartido... Bueno, y por los consejos, las conversaciones, tu humor, tus cinco videos de YouTube de cortesía antes de comer, el apoyo y los abrazos en los momentos indicados.

Gracias a vosotros Bego, Ari, Nahikari, Lucia, Sergio y Javi. Habéis sido parte de mí de una forma tan especial, que a veces, ni siquiera he podido agradeceróslo como debería. Sólo espero que sepáis que tenéis una amiga de Madrid para siempre. A Bego, gracias por ser el lado positivo de las cosas porque, aunque a veces me ha resultado imposible llegar a entenderlo, al final he comprendido que lo hacías por mí, siempre por mí. Gracias por tu cariño, por tu confianza, por tu buen humor, por ser tu. Espero que sepas, que vales muchísimo, que no estás ni mucho menos en el tope de lo que eres, que vas a ser lo que quieras ser. Gracias Ari, por ser tan leal, tan noble, tan adorablemente Asperger. Porque nuestros comienzos fueron duros, pero nuestros finales han sido todo lo contrario. Gracias por tus arrebatos de sinceridad desde el cariño, por tu psicología alternativa y por haberme ayudado a dar un paso que, sin ti, no hubiera dado. Gracias Nahi, por tu locura, por moverte desde la tripa, por fluir en un kayak, en las calles de Madrid y en todas nuestras noches, por hacerme fluir contigo. Eres top, y aunque no puedo explicarlo (porque esto quedará para

la posteridad), tu sabes los motivos. A ti Lucia, por ser una verdadera amiga. Por haber estado siempre. Por tu cariño, por tus llamadas de teléfono de dos horas, por comprenderme, entenderme, acompañarme, por conocerme de verdad. Gracias porque sé que esto ha sido nuestro comienzo y no nuestro contexto. Te adoro. A ti Sergio, simplemente no creo que tenga líneas para agradecértelo todo. Gracias por ser aire fresco, por haber compartido conmigo tu vitalidad, tus enfados y los míos, tus sueños, tu pasado y tu presente. Gracias por hacerme sentir que los que te quieren estarán y los que no, se marcharán. Porque aparte de guapísimo (...), eres inteligente, constante, sincero, cariñoso y humilde (el más humilde). Y espero que todo lo que has vivido aquí, sólo te haga entender que no hay nadie que pueda taparte. Y por último a ti, Javi. Por tu cariño, por esa complicidad tan especial, por todos los momentos que hemos compartido durante tu tesis porque, aunque las cosas hayan cambiado rápido, tu compañía ha sido lo mejor de venir a trabajar muchas veces. Gracias por haber sido mi confidente y haberme dejado ser la tuya, por haber sido mi mitad durante este tiempo, y por haber disfrutado de mis logros como si fueran tuyos; así que, en cierto modo, esta Tesis es también tuya. Gracias por todo esto y por todo lo demás. De corazón, gracias por haberme cuidado tanto durante este tiempo.

Gracias a los de siempre: Alberto, por haber compartido todo mi pasado y mi presente y porque sé que no puedo vivir sin ti; a ti Pin, por tu energía, por tu cariño, por tu amistad a pesar del tiempo, del espacio y de las personas que nos rodeaban, nos rodearon y nos rodearán; a ti Sandra, por hacerme sentir que da igual la distancia y porque simplemente verte me ha hecho feliz en los momentos más oscuros; a ti Ka, por compartir horas de viaje conmigo, incluso en zonas sin cobertura; y tus visitas de 24 horas (o incluso menos). Y a vosotros Lucky, Jevy, Nacho, Lesmes y Nani, por las visitas a veces de fantasía y otras veces planeadas, que me han hecho sentir en casa a muchos km de distancia; a David y Aly, por seguir acogiéndome como el primer día, y por incitarme a volver cada vez que os veo; y a ti Dani, en cierto modo, por haberme hecho llegar hasta aquí.

Gracias a mi familia. Mamá y papá, gracias por quererme y cuidarme

incondicionalmente. Por capear el temporal siempre a mi favor. Por haberme construido y reconstruido. Por soportarme, por apoyarme, e incluso, sostenerme. Por haberme dado el margen que he necesitado sin juzgarme, por haberme hecho sentir siempre protegida, siempre acompañada. Porque sé que habéis sufrido conmigo. Gracias por aguantar a mi lado. A ti Andrea. gracias por verme mejor de lo que soy, por soñar conmigo, por crecer conmigo, por preocuparte por mis problemas como si fueran tuyos, por quererme como lo haces. Ojalá algún día pueda ser sólo la mitad de lo que tu eres. Gracias, a los tres, porque si pudiera, volvería a elegirlos. Y a Lorenzo y Tere, Tamara y Kike, Ele y Teresa. Gracias por hacerme sentir parte de vuestra familia. Os quiero.

Y, por último, gracias a ti Loren. Gracias por aparecer, por elegir una vida conmigo, por acompañarme en este camino. Gracias por esperarme después de cada congreso, curso o estancia, y recibirme siempre con una sonrisa. Por estar ahí cuando los experimentos se complicaban, y durante las ausencias los fines de semana. Por escuchar todas las presentaciones, como si entendieses algo, sólo para animarme. Gracias por luchar conmigo cada día, por compartir conmigo lo mejor de esto; pero, sobre todo, por compartir lo peor. Gracias por hacerme sentir a salvo, y por ser mi hogar en los días más extraños y confusos. Gracias por recordarme cada día quién soy, y por confiar en mí más que yo misma. Gracias por tu cariño, por tu paciencia, por tus sonrisas, por los bailes en la cocina, y por las dos pequeñas grandes revoluciones que llenan de pelos y alegría cada rincón de casa. Gracias porque tú has sido todo en este viaje: mi compañero, mi amigo, mi familia, mi vida. Gracias por mirarme como me miras, quererme como me quieres, y por cuidarme como lo haces. Sin ti, esto nunca hubiera sido posible. Lo hemos conseguido. Ahora sí, nos toca vivir. Te quiero.

A mi familia.
A ti.

Lista de Abreviaturas	4
Lista de Figuras	12
Lista de Tablas	18
Resumen & Abstract	22
Introducción	28
1. Aparato respiratorio humano: anatomía, microbioma e inmunidad innata	28
1.1. Anatomía y características generales del tracto respiratorio humano.....	28
1.2. Microbioma del tracto respiratorio humano.....	29
1.3. Inmunidad innata del tracto respiratorio humano.....	30
1.3.1. Barreras mecánicas.....	30
1.3.2. Elementos celulares.....	31
1.3.3. Factores humorales.....	32
1.3.4. Inmunidad nutricional.....	35
2. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	37
2.1. Factores de riesgo en el desarrollo de EPOC.....	38
2.2. Diagnóstico de la EPOC.....	40
2.3. Fisiopatología de la EPOC.....	40
2.3.1. Inflamación crónica.....	42
2.3.2. Estrés oxidativo.....	43
2.3.3. Actividad proteolítica.....	44
2.3.4. Hipersecreción mucosa.....	44
2.3.5. Remodelación de ECM.....	45
2.3.6. Alteración metabólica.....	46
2.3.7. Disfunción mitocondrial y senescencia celular.....	46
2.4. Fases cíclicas en la progresión de la EPOC: fase estable y exacerbación.....	47
2.5. Tratamiento de la EPOC.....	49
2.6. Utilización de modelos de experimentación animal en el estudio de la fisiopatología de la EPOC.....	51
3. <i>Haemophilus influenzae</i>: comensal y patógeno oportunista respiratorio humano	54
3.1. Tratamiento de la infección por <i>H. influenzae</i>	54
3.2. Mecanismos moleculares de variación genómica de <i>H. influenzae</i>	55
3.3. Estrategias de persistencia y virulencia de <i>H. influenzae</i>	56
3.3.1. Evasión de factores solubles del sistema inmune.....	56
3.3.2. Interacción con proteínas de ECM.....	61
3.3.3. Formación de biopelículas.....	61
3.3.4. Formación de vesículas de membrana externa.....	62

3.3.5. Infección del epitelio respiratorio.....	62
3.3.6. Interacción patógeno-fagocitos profesionales	64
3.4. Identificación de factores de virulencia de <i>H. influenzae</i>	64
Hipótesis y Objetivos	70
Capítulo 1: “Los sistemas de adquisición de hemina de <i>Haemophilus influenzae</i> actúan de manera coordinada y multifuncional para evadir la inmunidad nutricional y contribuir a la patogénesis e infección respiratoria”	
1.1. Resumen	74
1.2. Introducción	76
1.3. Materiales y Métodos	78
1.3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.....	78
1.3.2. Generación de cepas mutantes de <i>H. influenzae</i>	79
1.3.3. Crecimiento bacteriano.....	81
1.3.4. Determinación semicuantitativa de la unión de hemina a la superficie bacteriana.....	82
1.3.5. Cocultivo de HiNT3655 <i>luxABCDE</i> con cepas de <i>H. influenzae</i> donadoras de hemina.....	82
1.3.6. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.....	83
1.3.7. Extracción de ARN y análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	84
1.3.8. Cultivo de células epiteliales e infección bacteriana.....	85
1.3.9. Secreción de IL-8.....	85
1.3.10. Infección pulmonar murina.....	86
1.3.11. Modelado computacional.....	87
1.3.12. Análisis estadístico.....	88
1.4. Resultados	
1.4.1. Contribución diferencial de los sistemas de adquisición de Fe-hemina a la infección respiratoria por HiNT.....	88
1.4.2. Los sistemas de adquisición de Fe-hemina de HiNT están relacionados a nivel transcripcional.....	90
1.4.3. Las proteínas SapA, HbpA y HxuA participan en la donación de hemina entre cepas de HiNT	94
1.4.4. Base estructural de la unión de la molécula de hemina a las proteínas HbpA, SapA, PE y HxuA.....	96
1.4.5. La expresión de los genes de adquisición de Fe-hemina de HiNT está regulada por los niveles de hemina disponibles.....	101

1.4.6. La disponibilidad de hemina favorece la interacción de HiNT con el epitelio respiratorio humano.....	102
1.4.7. El almacenamiento de hemina en la superficie bacteriana contribuye a prevenir su toxicidad.....	103
1.4.8. Contribución de las proteínas de unión a hemina multifuncionales a la patogénesis de HiNT.....	104
Capítulo 2: “La inactivación de la timidilato sintetasa ThyA de <i>Haemophilus influenzae</i> modula la resistencia antibiótica y su interacción con el sistema respiratorio”	
2.1. Resumen.....	110
2.2. Introducción.....	112
2.3. Materiales y Métodos.....	114
2.3.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	114
2.3.2. Escrutinio de aislados clínicos de <i>H. influenzae</i> auxótrofos a timidina.....	115
2.3.3. Susceptibilidad bacteriana a TxS en condiciones no estandarizadas.....	116
2.3.4. Curvas de crecimiento bacteriano.....	116
2.3.5. Microscopía confocal.....	117
2.3.6. Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i> , TEM).....	117
2.3.7. Extracción de ARN y análisis de expresión génica mediante qRT-PCR.....	117
2.3.8. Autoagregación bacteriana.....	118
2.3.9. Cuantificación de ChoP.....	118
2.3.10. Unión de factores de complemento a HiNT.....	119
2.3.11. Cultivo celular e infección bacteriana.....	120
2.3.12. Secreción de IL-8.....	121
2.3.13. Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i> , SEM).....	121
2.3.14. Infección pulmonar murina.....	121
2.3.15. Análisis histopatológico.....	122
2.3.16. Análisis estadístico.....	123
2.4. Resultados.....	123
2.4.1. Aislamiento de una cepa HiNT dependiente de timidina de una muestra de esputo de un paciente EPOC tratado con TxS.....	123
2.4.2. Generación y caracterización de cepas <i>H. influenzae</i> auxótrofas a timidina.....	126
2.4.3. La dependencia de timidina causa defectos de crecimiento en <i>H. influenzae</i>	128
2.4.4. La auxotrofia a timidina modifica la expresión del transportador de nucleósidos codificado el gen <i>nupC</i> en <i>H. influenzae</i>	130
2.4.5. La auxotrofia a timidina reduce la expresión de ChoP y la deposición de C3b en <i>H. influenzae</i>	132

2.4.6. La dependencia de timidina modifica la interacción de <i>H. influenzae</i> con el epitelio respiratorio humano.....	134
2.4.7. La activación del gen <i>thyA</i> atenúa la virulencia de <i>H. influenzae</i> y confiere ventaja al patógeno durante el tratamiento antibiótico con TxS <i>in vivo</i>	136
Capítulo 3: “Caracterización de un modelo preclínico de infección aguda de pulmón enfisematoso murino, y su aplicación a la identificación de factores de virulencia de <i>Haemophilus influenzae</i> mediante Tn-seq”	
3.1. Resumen	144
3.2. Introducción	146
3.3. Materiales y Métodos	147
3.3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	147
3.3.2. Curvas de crecimiento y cuantificación de luminiscencia bacteriana <i>in vitro</i>	147
3.3.3. Preparación de inóculos bacterianos para infección respiratoria murina.....	148
3.3.4. Infección respiratoria murina, determinación de carga bacteriana, y generación de enfisema pulmonar.....	148
3.3.5. Análisis histopatológico.....	151
3.3.6. Determinación de ácidos grasos en pulmón murino.....	151
3.3.7. Extracción de ARN pulmonar murino, y análisis mediante qRT-PCR.....	152
3.3.8. Determinación de luminiscencia pulmonar, pruebas de función ventilatoria (PFV) y microtomografía computerizada (micro-CT).....	152
3.3.8.1. Determinación de luminiscencia bacteriana durante la infección respiratoria.....	153
3.3.8.2. PFV.....	153
3.3.8.3. Micro-CT.....	154
3.3.9. Modelo de reinfección pulmonar murino.....	154
3.3.10. Generación de una genoteca de mutantes de <i>H. influenzae</i> mediante transposición <i>in vitro</i> , escrutinio Tn-seq <i>in vivo</i> , y análisis bioinformático	155
3.3.10.1. Generación de una genoteca de mutantes de <i>H. influenzae</i> mediante transposición <i>in vitro</i>	155
3.3.10.2. Escrutinio <i>in vivo</i> Tn-seq de una genoteca de mutantes de <i>H. influenzae</i>	156
3.3.10.3. Análisis bioinformático del resultado de Tn-seq.....	159
3.3.11. Análisis estadístico.....	159
3.4. Resultados	159
3.4.1. Caracterización de la cepa <i>H. influenzae</i> Xen21.....	159
3.4.2. Optimización de las condiciones de infección respiratoria murina por <i>H. influenzae</i> Xen21.....	161

3.4.3. Generación de enfisema pulmonar murino mediante instilación de elastasa porcina pancreática.....	163
3.4.4. Infección aguda del pulmón enfisematoso murino por HiNT.....	165
3.4.5. La inducción de enfisema retrasa la recuperación pulmonar tras la infección por HiNT.....	166
3.4.6. La infección respiratoria por HiNT modula la expresión génica en pulmón.....	169
3.4.7. Modelado <i>in vivo</i> de la exacerbación frecuente de naturaleza bacteriana en el pulmón enfisematoso.....	171
3.4.8. Escrutinio <i>in vivo</i> de factores de virulencia de HiNT.....	174
Discusión.....	184
Conclusiones.....	202
Referencias.....	206
Anexo I: Tablas Suplementarias.....	262
Anexo II: Publicaciones.....	280

Lista de Abreviaturas

AATD	<i>Alpha-1 Antitrypsin Deficiency</i> , deficiencia de la alfa-1antitripsina
Ac	Anticuerpo
Ac-PGP	Matricina PGP acetilada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNds	ARN de doble hebra
ARNm	ARN mensajero
ARNss	ARN monocatenario
ATHF	Ácido tetrahidrofólico
AZM	Azitromicina
BHI	<i>Brain-Heart Infusion medium</i> , medio infusión cerebro-corazón
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i> , proteína morfogénica ósea
C	Complianza
CDMM	<i>Chemically Defined Minimal Medium</i> , medio mínimo químicamente definido
ChoP	Fosforilcolina
CI	Corticoides Inhalados
CIMA	Centro de Investigación Médica Aplicada
CLR	<i>C-type Lectin Receptor</i> , receptor tipo C-lectina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
CRP	<i>C-Reactive Protein</i> , proteína C-reactiva
Ct	Ciclo umbral comparativo
DE	Desviación Estándar
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHPS	Dihidropteroato sintetasa
DMT1	<i>Divalent Metal Transporter 1</i> , transportador de metal divalente 1
DO	Densidad Óptica
E	Elastancia
ECM	<i>Extracelullar Matrix</i> , matriz extracelular

EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , factor de crecimiento epidérmico
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
EPP	Elastasa Porcina Pancreática
Erm	Eritromicina
ERS	<i>European Respiratory Society</i> , Sociedad Respiratoria Europea
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
eV	Electrovoltio
FAMES	<i>Fatty Acid Methyl Ester</i> , ésteres metílicos de ácidos grasos
Fe	Hierro
FEV ₁	<i>Forced Expiratory Volume</i> , volumen espiratorio forzado el primer segundo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FVC	<i>Forced Vital Capacity</i> , capacidad vital forzada
GC-MS	<i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> , cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> , factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
gr	Gramo
GSSG	Glutación disulfuro
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
hCAP	Catelicidina humana
HE	Hematoxilina-Eosina
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> serotipo b
HiNT	<i>Haemophilus influenzae</i> No Tipificable
HITS	<i>High-throughput Insertion Tracking by deep Sequencing</i>
hpi	Horas Post-Infeción
HS	<i>Human Serum</i> , suero humano
HTM	Medio <i>Haemophilus Test Medium</i>
HUB	Hospital Universitario de Bellvitge
hβD	<i>Human β Defensin</i> , β defensina humana
IgA	Inmunoglobulina A
IHF	<i>Integration Host Factor</i> , factor de integración de huésped

IL	Interleucina
IFN	Interferón
IRE	<i>Iron Responsive Element</i> , elemento de respuesta a hierro
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i> , factor regulador de interferón
IRP	<i>Iron Regulatory Protein</i> , proteína reguladora de hierro
kg	Kilogramo
kV	Kilovatios
LABA	Broncodilatador de larga duración β 2-agonista
LAMA	Broncodilatador de larga duración antagonista del receptor muscarínico
LB	Medio Luria Bertani
LBA	Lavado broncoalveolar
LL37	Catelicidina LL37
LOS	Lipooligosacárido
LPS	Lipopolisacárido
LRP1	<i>Low density Lipoprotein Receptor-related Protein 1</i> , receptor de lipoproteína de baja densidad 1
LT	Leucotrieno
m/z	Masa/carga
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> , quinasas activadas por mitógenos
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> , proteína quimiotáctica de monocitos 1
mg	Miligramos
MH-F	Medio Mueller Hinton-Fastidioso
Micro-CT	Microtomografía Computerizada
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteasa
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i> , multiplicidad de infección
NAD	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i> , trampas extracelulares de neutrófilos
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i> , factor nuclear- κ B
ng	Nanogramos

Lista de Abreviaturas

NLR	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptor</i> , receptor con dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i> , dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
Nramp1	<i>Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1</i> , proteína de macrófagos asociada a resistencia natural 1
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2</i> , factor nuclear eritroide 2
O ₂	Oxígeno
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i> , proteína de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMVs	<i>Outer Membrane Vesicles</i> , vesículas de membrana externa
p/vol	Peso/volumen
PABA	Acido para aminobenzoico
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> , patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBP	<i>Penicillin Binding Proteins</i> , proteínas de unión a penicilinas
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , solución salina fosfatada
pCO ₂	Presión de dióxido de carbono
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PDE4 _i	Inhibidores de fosfodiesterasa 4
PFA	Parafomaldehído
PFV	Pruebas de Función Ventilatoria
pg	Picrogramo
PGP	Matricina Prolina-Glicina-Prolina
pO ₂	Presión de oxígeno
PPIX	Protoporfirina IX
PRRs	<i>Pathogen Recognition Receptors</i> , receptores de reconocimiento de PAMPs
PxE	Polimixina E
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time-PCR</i> , PCR cuantitativa en tiempo real
R	Resistencia
r.p.m	Revoluciones Por Minuto
RFI	Índice de fluorescencia relativo
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , especies reactivas de oxígeno

RT	Retrotranscripción
SABA	Broncodilatador de corta duración β 2-agonista
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i> , fenotipo secretor asociado a la senescencia
sBHI	Medio BHI suplementado
SCV	<i>Small Colony Variants</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> , microscopía electrónica de barrido
sHTM	Medio HTM suplementado
Sirt-1	Sirtuina-1
SLPI	<i>Secretory Leukocyte Protease Inhibitor</i> , inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora
SMX	Sulfametoxazol
SP	<i>Surfactant Protein</i> , proteína de surfactante
Spec	Espectinomicina
spi	Semana Post-Infección
TA	Temperatura Ambiente
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> , microscopía electrónica de transmisión
TFR1	<i>Transferrin Receptor 1</i> , receptor de transferrina 1
TGF- β 2	<i>Transforming Growth Factor-β2</i> , factor de crecimiento transformable- β 2
Thy	<i>Thymidine</i> , timidina
TIMPs	<i>Tissue Inhibitor of Matrix Metaloproteinase</i> , inhibidor tisular de metaloproteasas
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> , receptores tipo Toll
TMP	Trimetroprim
Tn-seq	<i>Transposon-sequencing</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> , factor de necrosis tumoral- α
TRAP	<i>Promoter Trap system</i>
TREP	<i>Transformed Recombinant Enrichment Profiling</i>
TxS	Cotrimoxazol
U	Unidades
u.f.c.	Unidades Formadoras de Colonias
UPNa	Universidad Pública de Navarra
UTR	<i>Untranslated Regions</i> , regiones no traducidas
VRS	Virus Respiratorio Sinticial

Lista de Abreviaturas

WT	<i>Wild-type</i> , cepa silvestre
μA	Microamperio
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol

Lista de Figuras

Introducción general

Figura 1. Gradientes fisiológicos y microbianos en el sistema respiratorio humano.

Figura 2. Elementos implicados en la importación y exportación celular de Fe pulmonar.

Figura 3. Procesos y elementos implicados en la patogénesis y progresión de la EPOC.

Figura 4. Hipótesis del círculo vicioso en la progresión de la EPOC.

Figura 5. Mecanismos de persistencia y virulencia de HiNT.

Figura 6. Ruta de biosíntesis de hemina en bacterias Gram negativas. Representación esquemática de los sistemas de captación de Fe-hemina de HiNT.

Figura 7. Escrutinios utilizados para la identificación de factores de virulencia de HiNT.

Capítulo 1

Figura 8. Representación esquemática de los sistemas de captación de Fe-hemina analizados en este trabajo.

Figura 9. Efecto de la inactivación de los sistemas de captación de Fe-hemina en el crecimiento de *H. influenzae*.

Figura 10. Evaluación sistemática de la contribución de seis sistemas de adquisición de Fe-hemina de HiNT a la interacción patógeno-hospedador en las vías respiratorias.

Figura 11. Expresión coordinada de genes que codifican sistemas de adquisición de Fe-hemina de HiNT.

Figura 12. La donación de hemina por la cepa HiNT375 WT es limitada.

Figura 13. Crecimiento de las cepas RdKW20 WT, $\Delta hxcBA$, $\Delta sapAB$, $\Delta hbpA$ y $\Delta hitBC$ en sBHI.

Figura 14. HxcBA, SapABCDFZ y HbpA participan en la unión y donación de hemina entre bacterias.

Figura 15. Alineamiento de secuencia de las proteínas de HpHbpA, HiHbpA, HiSapA y EcDppA.

Figura 16. Predicción estructural de la unión de hemina a HbpA y SapA.

Figura 17. Comparación del sitio de unión de ligando en HiHbpA, HpHbpA y EcDppA

Figura 18. Predicción estructural de la unión de hemina a PE y HxcA.

Figura 19. La inactivación de los sistemas de unión de Fe-hemina disminuye la interacción de HiNT con el epitelio respiratorio, y es dependiente de la disponibilidad de hemina.

Figura 20. Implicación de los sistemas de captación de Fe-hemina en la prevención de toxicidad.

Figura 21. Multifuncionalidad de los sistemas de adquisición de Fe-hemina.

Capítulo 2

Figura 22. Mecanismo de acción del cotrimoxazol.

Figura 23. Caracterización de un aislado clínico auxótrofo a timidina, HiNT8233.

Figura 24. Predicción estructural de las proteínas ThyA_{HiNT8233}, ThyA_{RdKW20} y ThyA_{HiNT375}; y solapamiento de ThyA_{HiNT8233}-ThyA_{RdKW20} y ThyA_{RdKW20}-ThyA_{HiNT375}.

Figura 25. La auxotrofia a timidina modifica el crecimiento y la morfología de *H. influenzae*.

Figura 26. El crecimiento de *H. influenzae* es modificado por la disponibilidad de timidina.

Figura 27. La inactivación de *thyA* en *H. influenzae* modula la expresión del gen *nupC*, que codifica un putativo transportador de nucleósidos; pero no de la timidina quinasa TdK.

Figura 28. La auxotrofia a timidina reduce el nivel de ChoP en HiNT375 y RdKW20, y la unión de C3b en HiNT375.

Figura 29. La inactivación del gen *thyA* modula la interacción de *H. influenzae* con el epitelio respiratorio.

Figura 30. La presencia de C3 no afecta la infección epitelial por *H. influenzae*.

Figura 31. La inactivación de *thyA* atenúa la virulencia de *H. influenzae* y confiere ventaja durante el tratamiento con TxS *in vivo*.

Capítulo 3

Figura 32. Modelo de exacerbación recurrente por infección bacteriana aguda.

Figura 33. Representación esquemática del escrutinio *in vivo* de factores de virulencia mediante Tn-seq.

Figura 34. Caracterización de la cepa *H. influenzae* Xen21, RdKW20*luxABCDE*.

Figura 35. Optimización de la infección pulmonar murina por *H. influenzae* Xen21: inóculo bacteriano y vía de administración.

Figura 36. La instilación de EPP induce lesión pulmonar compatible con enfisema.

Figura 37. Dinámica de la infección bacteriana pulmonar *in vivo*.

Figura 38. La infección respiratoria por HiNT modifica los PFV e induce inflamación pulmonar murina.

Figura 39. La infección por HiNT modula la expresión de genes en el pulmón murino.

Figura 40. La lesión enfisematosa favorece la reinfección pulmonar por HiNT.

Figura 31. Caracterización de un modelo de exacerbación recurrente por infección bacteriana aguda: dinámica de PFV e imagen micro-CT.

Figura 42. Representación esquemática del resultado del escrutinio *in vivo* de factores de virulencia de *H. influenzae*.

Discusión General

Figura 43. Modelo que muestra la posible multifuncionalidad de cuatro sistemas de adquisición de hemina de HiNT.

Lista de Tablas

Introducción General

Tabla 1. Métodos utilizados para inducción de lesiones compatibles con la EPOC en ratón.

Capítulo 1

Tabla 2. Regulación por Fur: expresión de genes que codifican proteínas integrantes de sistemas de captación de Fe-hemina en *H. influenzae*.

Tabla 3. Expresión génica en HiNT375 WT y cepas mutantes, tras su crecimiento en BHI-NAD y en sBHI (BHI-NAD/sBHI).

Capítulo 2

Tabla 4. Crecimiento bacteriano en diferentes medios y condiciones.

Tabla 5. Evaluación de lesiones histopatológicas de vías aéreas de ratones tratados con solución vehículo (control) o con TxS, e infectados intranasalmente con las cepas HiNT375 WT o $\Delta thyA$.

Capítulo 3

Tabla 6. Protocolos de manipulación de ratones CD1 llevados a cabo en este trabajo.

Tabla 7. Evaluación de lesiones histopatológicas en pulmón sano y enfisematoso procedente de animales no infectados (V/Hi- y E/Hi-) e infectados (V/Hi+ y E/Hi+).

Tabla 8. Genes identificados mediante Tn-seq implicados en la infección de pulmón murino con función normal, a 12 y 24 hpi.

Tabla 9. Genes identificados mediante Tn-seq implicados en la infección de pulmón murino enfisematoso, a 12 y 24 hpi.

Tabla 10. Genes diferencialmente implicados en la infección *in vivo* de pulmón murino con función normal y enfisematoso, a 12 y 24 hpi.

Anexo I: Tablas suplementarias

Tabla A1. Genes de HiNT identificados en los escrutinios *in vitro* e *in vivo*, y fenotipos asociados.

Tabla A2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Tabla A3. Plásmidos utilizados en este trabajos.

Tabla A4. Cebadores utilizados en este trabajo.

Tabla A5. Medio mínimo químicamente definido (CDMM): composición y preparación.

Tabla A6. Estadística detallada de las soluciones de HADDOCK de la interacción de

hemina con las proteínas de HiNT HbpA, SapA, SapA-variante truncada, PE y HxuA.

Resumen & Abstract

Este trabajo de **Tesis Doctoral** se centra en el estudio de las bases moleculares de la infección respiratoria por la bacteria *Haemophilus influenzae*, miembro del microbioma respiratorio humano y patógeno oportunista de especial relevancia en la progresión de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

El **Capítulo 1** analiza la contribución de un panel de sistemas bacterianos de captación de hierro-hemina en la evasión de la inmunidad nutricional y en la infección respiratoria por *H. influenzae*. La inactivación génica y el fenotipado sistemático mostró la multifuncionalidad de los sistemas HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA-DppBCDF y PE, implicados en unión-almacenamiento y donación de hemina entre bacterias, prevención de toxicidad, infección epitelial respiratoria, resistencia a péptidos antimicrobianos e importación de glutatión, contribuyendo así a la patogénesis de *H. influenzae in vivo*. Esta multifuncionalidad resultó ser específica de sistema, limitando la redundancia funcional. Los sistemas implicados actuaron de forma coordinada, respondiendo a la disponibilidad de hemina en el medio extracelular.

El **Capítulo 2** aborda la relación existente entre la dependencia a timidina, resistencia antibiótica y virulencia de *H. influenzae*. Uno de los mecanismos de resistencia al antibiótico cotrimoxazol (TxS) es la auxotrofia a timidina causada por mutaciones en el gen *thyA*, que codifica la enzima timidilato sintetasa ThyA. Tras la identificación de una cepa auxótrofa a timidina aislada de una muestra respiratoria de un paciente EPOC tras recibir tratamiento con TxS, la inactivación de *thyA* y su fenotipado mostró que, además de aumentar la resistencia a TxS, esta mutación modifica la morfología, autoagregación, fosforilcolina superficial, unión a C3b e infección del epitelio respiratorio por *H. influenzae*, aspectos parcial o totalmente revertidos por la presencia y posible captación de timidina exógena. Si bien la inactivación de *thyA* atenuó la virulencia de *H. influenzae*, también disminuyó la eficacia del tratamiento con TxS *in vivo*, aspectos que pueden ser de especial relevancia en la práctica clínica.

El **Capítulo 3** caracteriza un modelo murino que mimetiza la exacerbación infecciosa del pulmón enfisematoso, consistente en inducción de enfisema mediante administración de elastasa e infección respiratoria aguda por *H. influenzae*. La dinámica de la infección fue analizada mediante luminiscencia y cuantificación de carga bacteriana. Los efectos en el sistema respiratorio murino fueron analizados mediante pruebas de función ventilatoria, microtomografía computerizada, histopatología y monitorización de la expresión génica. La exacerbación recurrente de etiología infecciosa reveló un impacto

significativo en el pulmón enfisematoso. Por último, este modelo fue utilizado en un escrutinio de factores de virulencia de *H. influenzae* mediante Tn-seq *in vivo*, revelando un panel de genes bacterianos implicados en la infección pulmonar con potencial para su explotación futura en el desarrollo de nuevos antimicrobianos.

This **PhD Thesis** has been focused on the study of the molecular basis of respiratory infection by the bacterium *Haemophilus influenzae*, a member of the human respiratory microbiome, but also an opportunistic pathogen of main relevance in the progression of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD).

Chapter 1 analyzes the contribution of a panel of bacterial iron-hemin uptake systems to evade the host nutritional immunity during respiratory infection by *H. influenzae*. Gene inactivation and systematic phenotyping of the HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA-DppBCDF and PE systems, was performed. These systems are involved in hemin storage-binding, hemin donation between bacteria, prevention of hemin toxicity, respiratory epithelial infection, resistance to antimicrobial peptides and glutathione importation, thus contributing to the pathogenesis of *H. influenzae*. Such multifunctionality was found to be system specific, thus limiting functional redundancy, and these systems act in a coordinated manner, responding to the availability of hemin in the extracellular medium.

Chapter 2 addresses the relationship between *H. influenzae* thymidine auxotrophy, antibiotic resistance and virulence. Thymidine auxotrophy caused by mutations in the *thyA* gene, encoding the thymidylate synthetase ThyA, triggers resistance to cotrimoxazole (TxS). Once isolated a thymidine auxotroph clinical strain from a respiratory sample of an exacerbated COPD patient after receiving treatment with TxS, inactivation of the *thyA* gene showed that, in addition to increasing resistance to TxS, it modifies the morphology, self-aggregation, phosphorylcholine content, binding to C3b and respiratory epithelial infection by *H. influenzae*, in turn related to the presence and likely uptake of exogenous thymidine. Although inactivation of the *thyA* gene attenuates *H. influenzae* virulence, it also decreases the efficacy of treatment with TxS *in vivo*, which may be of special relevance in the clinical practice.

Chapter 3 presents the characterization of a pre-clinical murine model mimicking an infectious exacerbation of the emphysematous lung, consisting of emphysema induction by administration of elastase and acute respiratory infection by *H. influenzae*. Infection dynamics were analyzed by bacterial luminescence and load quantification. The effects on the murine respiratory system were analyzed by ventilatory parameters function, micro-tomography, histopathology and monitoring gene expression. A recurrent exacerbation of infectious etiology revealed a significant impact on the emphysematous lung. Finally, this model was used in a screening of *H. influenzae* virulence factors, by

murine pulmonary infection with a library of bacterial mutants generated by transposition and identification of transposition events by Tn-seq. This screening revealed a panel of bacterial genes involved in lung infection, with potential for its future exploitation in the development of novel antimicrobials.

Introducción

1. Aparato respiratorio humano: anatomía, microbioma e inmunidad innata

1.1. Anatomía y características generales del tracto respiratorio humano

El sistema respiratorio humano está formado por los pulmones y una secuencia de conductos aéreos que los comunican con el medio externo, proporcionando oxígeno (O₂) y eliminando dióxido de carbono (CO₂) del organismo. Anatómicamente, el sistema respiratorio se divide en vías superiores (cavidad nasal y faringe) e inferiores (laringe, tráquea y pulmones, con bronquios, bronquiolos y alveolos).

El aire entra al tracto respiratorio superior a través de las fosas nasales que lo conducen hacia los cornetes nasales, faringe, glotis y laringe, descendiendo hacia la tráquea. Los cornetes nasales son huesos finos que aumentan la superficie respiratoria, humedecen y calientan el aire circulante por presencia de gran cantidad de capilares (Reznik, 1990). Excepto la cavidad nasal, el tracto respiratorio superior presenta un epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado formado por células ciliadas cilíndricas, células basales y células caliciformes responsables de la producción y secreción de una capa mucosa (Reznik, 1990).

La laringe es un tubo cilíndrico y rígido situado entre la faringe y la tráquea, que impide la entrada de elementos sólidos al aparato respiratorio durante la deglución, y es responsable de la fonación. La laringe está revestida de mucosa respiratoria, excepto en las regiones superiores de la epiglotis y las cuerdas vocales, donde está revestida por epitelio escamoso estratificado. La tráquea termina a nivel del ángulo esternal y la apófisis espinosa de la cuarta vértebra torácica. Está formada por cartílagos hialinos abiertos en su parte dorsal que impiden su oclusión, y por una capa de músculo liso, responsable de la expulsión rápida y brusca de aire durante la espiración (tos). A continuación, se divide en los bronquios principales derecho e izquierdo, que penetran en los pulmones, localizados cerca de la columna vertebral a ambos lados del corazón, y divididos en lóbulos (tres lóbulos en el pulmón derecho; dos lóbulos en el pulmón izquierdo). Los bronquios principales se ramifican sucesivamente en bronquios lobulares (que penetran en cada lóbulo), bronquios segmentarios, bronquiolos y bronquiolos terminales, formando el árbol bronquial. Los bronquios principales,

lobulares y segmentarios están tapizados por epitelio pseudoestratificado columnar ciliado; los bronquiolos segmentarios, por epitelio columnar simple ciliado; y los bronquiolos y bronquiolos terminales, por epitelio cuboidal simple no ciliado. Los bronquiolos terminales dan lugar a los alveolos, sacos respiratorios tapizados por epitelio simple (Maina, 2000). El epitelio escamoso simple de los alveolos está formado por neumocitos tipo I y tipo II. La barrera alveolo-capilar es la zona alveolar donde se produce el intercambio gaseoso, y está formada por surfactante pulmonar, neumocitos tipo I, lamina basal del neumocito y endotelio capilar.

1.2. Microbioma del tracto respiratorio humano

El microbioma respiratorio es el conjunto de microorganismos residentes en las vías aéreas y el parénquima pulmonar (Sze et al., 2014). El sistema respiratorio alberga un microbioma funcional, cuya cantidad disminuye progresivamente desde el tracto superior al inferior, implicado en maduración estructural y mantenimiento de la homeostasis del tracto respiratorio (Yun et al., 2014), organización de la inmunidad local (Gollwitzer et al., 2014; Olszak et al., 2012), y resistencia a la colonización por microorganismos patógenos (Man et al., 2017).

La composición del microbioma pulmonar es resultado de: (i) inhalación; (ii) transmigración de microorganismos de las vías respiratorias altas y las secreciones orales a los pulmones mediante fenómenos de microaspiración o dispersión directa por las mucosas; (iii) eliminación de patógenos por barrera mucociliar, tos e inmunidad respiratoria (equilibrio inmigración-eliminación) (Dickson et al., 2015; Willner et al., 2012); (iv) condiciones ambientales del sistema respiratorio: disponibilidad de nutrientes, pH, superficie respiratoria, presión de O_2 (pO_2), presión de CO_2 (pCO_2), humedad relativa, temperatura, densidad microbiana, e interacción con el epitelio respiratorio (**Figura 1**) (Wang et al., 2017).

Los microorganismos integrantes del microbioma respiratorio de individuos con función pulmonar normal son comunes en muestras orales, nasales y pulmonares de un mismo individuo, si bien varían significativamente entre individuos (Pragman et al., 2012). Los géneros bacterianos más comunes

(en orden decreciente en cuanto a cantidad relativa) son *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Alloicoccus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Rothia*, *Neisseria* y *Staphylococcus*, que provienen de la mezcla del microbioma oral (*Streptococcus*, género predominante; *Prevotella*, *Veillonella*, y *Rothia*), y nasal (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Alloicoccus*; géneros predominantes; y en menor medida *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, y *Rothia*) (Charlson et al., 2011; Dickson et al., 2017; Pragman et al., 2018; Segal et al., 2013).

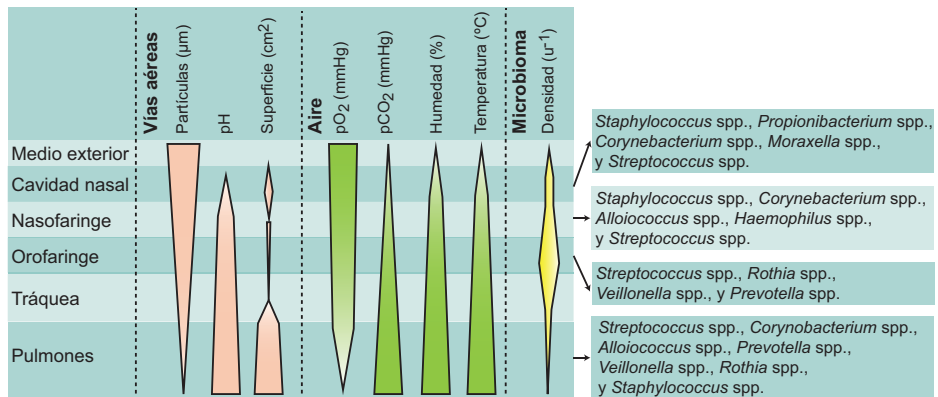


Figura 1. Gradientes fisiológicos y microbianos en el sistema respiratorio humano. Los parámetros indicados determinan la especificidad selectiva de cada nicho y, en último término, las comunidades microbianas a lo largo del tracto respiratorio. Adaptada de (Man et al., 2017).

1.3. Inmunidad innata del tracto respiratorio humano

El sistema respiratorio humano está constantemente expuesto a partículas y microorganismos ambientales. La eliminación de patógenos está facilitada por barreras mecánicas (barrera nasofaríngea, ramificación bronquial, barrera mucociliar), y orquestada por los elementos celulares (células epiteliales, macrófagos) y humorales (complemento, péptidos antimicrobianos, surfactante pulmonar) de la inmunidad innata, que minimizan los procesos inflamatorios y mantienen la homeostasis del tejido (Zhang et al., 2000).

1.3.1. Barreras mecánicas

La barrera nasofaríngea dificulta el paso al tracto respiratorio inferior de partículas o microorganismos de $>5 \mu\text{m}$ de diámetro, que quedan atrapados

en las vías respiratorias superiores (Perez et al., 2014). El epitelio respiratorio, con células ciliadas y secretoras de moco, está cubierto por una capa mucosa superficial que, en conjunto, constituye la barrera mucociliar. La capa mucosa está compuesta por mucinas (MUC5AC y MUC5B, principalmente) que proporcionan propiedades viscoelásticas y permiten capturar partículas inhaladas (Fahy & Dickey, 2010; Rose & Voynow, 2006; Voynow & Rubin, 2009), actuando como barrera física (Chilvers & O'Callaghan, 2000; Taylor, 2010). El batido mucociliar propulsa la capa flotante de restos celulares, microorganismos, partículas inhaladas y moco hacia la orofaringe, para su posterior deglución o expectoración (Thai et al., 2008).

1.3.2. Elementos celulares

Las partículas de $<5 \mu\text{m}$ de diámetro pueden acceder a las vías respiratorias inferiores, lo que requiere mecanismos de defensa adicionales. El epitelio respiratorio mantiene la integridad tisular mediante recambio celular, descamación, apoptosis y autofagia (Yang et al., 2014). Los neumocitos tipo I tienen función anatómica, cubriendo el 95% de la superficie alveolar, y generan una delgada barrera entre el espacio alveolar y los vasos sanguíneos. Los neumocitos tipo II cubren el 5% de la superficie alveolar, y están implicados en: mantenimiento de la tensión superficial alveolar mediante la síntesis, secreción y reabsorción de surfactante pulmonar; transporte de agua y sodio; metabolismo de compuestos xenobióticos; regeneración pulmonar (Fereol et al., 2008). Además, desempeñan un papel activo en la defensa pulmonar frente a patógenos mediante: (i) reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) a través de receptores de reconocimiento de PAMPs (*Pathogen Recognition Receptors*, PRRs); (ii) secreción de péptidos antimicrobianos; (iii) secreción de citocinas y quimiocinas que orquestan la respuesta inflamatoria; (iv) forman parte de la barrera física que impide el paso de patógenos al torrente sanguíneo, limitando la infección sistémica (Castranova et al., 1998; Chaudhuri & Sabroe, 2008; Mason et al., 2006; Rubovitch et al., 2007; Zhang et al., 2000).

Los macrófagos alveolares son células mononucleares que se diferencian a partir de monocitos sanguíneos generados durante la hematopoyesis en la médula ósea. Son fagocitos profesionales residentes en los pulmones que eliminan microorganismos mediante reconocimiento, fagocitosis y procesamiento fagolisosomal de material exógeno (~0.4-25 μm diámetro). Además, secretan mediadores inflamatorios que dirigen el reclutamiento de neutrófilos del torrente sanguíneo al espacio alveolar (Naito, 2008).

El reconocimiento específico de patógenos por monocitos, macrófagos, células epiteliales y células dendríticas se realiza mediante PRRs que incluyen: (i) receptores tipo-Toll (*Toll-like Receptor*, TLR), en macrófagos y células epiteliales; (ii) receptores de oligomerización de nucleótidos (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like* (NOD)-*Receptor*, NLR), en epitelio respiratorio (NOD1) y en macrófagos, monocitos y células dendríticas (NOD2) (Correa et al., 2012); (iii) receptores C-lectinas (*C-type Lectin Receptor*, CLR), en células epiteliales, macrófagos y células dendríticas (Torrelles et al., 2008); (iv) sensores de ácido desoxirribonucleico (ADN) (AIM2) (Hornung et al., 2009) y ácido ribonucleico (ARN) citosólicos (RLRs, MDA5) (Kawai & Akira, 2008; O'Dwyer et al., 2018). Los PAMPs incluyen lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano, flagelina, o ácidos nucleicos (ARN monocatenario, ARNss; de doble hebra, ARNds; islas de ADN Citosina-fosfato-Guanina) (O'Dwyer et al., 2018; Wiese et al., 2017). El reconocimiento de PAMPs por PRRs favorece la activación del factor nuclear- κB (*Nuclear Factor- κB* , NF- κB) (TLR, NLR, RLR, MDA5), los factores de regulación de interferón (*Interferon Regulatory Factor*, IRF)-3 (TLR, RLR, MDA5) o IRF-7 (RLR, MDA5), o quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK), que en conjunto, favorecen la liberación de interleucinas (IL) (IL-1, IL-6 e IL-8), factor de necrosis tumoral- α (*Tumor Necrosis Factor- α* , TNF- α), interferón (IFN), proteasas, lipasas, glicosidasas, mieloperoxidasas, óxido nítrico o peroxinitrito, con efectos proinflamatorios y actividad antimicrobiana (Hornung et al., 2009; Martin & Frevert, 2005; Sun et al., 2011; Wiese et al., 2017).

1.3.3. Factores humorales

Presentes en el fluido acuoso de la superficie respiratoria, que incluyen:

(i) **Proteínas del sistema de complemento**, sintetizadas por neumocitos tipo II (vía clásica: C2, C3, C4, C5; vía alternativa: factor B) y células bronquiales (C3) (Strunk et al., 1988; Varsano et al., 2000). Los niveles de síntesis y secreción de estas proteínas aumentan cuando las células productoras reciben estímulos inflamatorios (Bolger et al., 2007; Hogasen et al., 1995; Strunk et al., 1988).

(ii) **Péptidos y proteínas antimicrobianas**. Los péptidos antimicrobianos son moléculas anfipáticas catiónicas cuya interacción con las membranas bacterianas altera el potencial transmembrana, desencadenando la liberación de material citosólico y la muerte bacteriana. Además, presentan propiedades proinflamatorias (induciendo la expresión de citocinas y quimiocinas), actividad quimiotáctica, modulan la maduración de células dendríticas, y promueven la cicatrización y reparación del epitelio respiratorio por estimulación de la angiogénesis (Aarbiou et al., 2004; Brogden, 2005; Joo et al., 2016; Mansour et al., 2014; Salvado et al., 2013; Sitaram & Nagaraj, 2002). Pueden expresarse constitutivamente o ser inducidos por exposición a microorganismos, citocinas, factores de crecimiento, o micronutrientes como la vitamina D (Hiemstra et al., 2015). En las vías aéreas, están presentes defensinas (α y β) y catelicidinas (catelicidina humana-18, hCAP-18; catelicidina LL37, LL37) (Bals et al., 1998; Harder et al., 2001; Sorensen et al., 1997), que son sintetizadas por células epiteliales (β -defensina humana (*Human β Defensin*, h β D)-1, h β D-2, h β D-3; y LL-37), neutrófilos (LL-37 y α -defensinas) y macrófagos alveolares (LL-37) (Bals et al., 1998; Harder et al., 2001; Neumann et al., 2014a; Neumann et al., 2014b; Sorensen et al., 1997).

Asimismo, las proteínas antimicrobianas implicadas en la defensa del sistema respiratorio son: lisozima (producida por macrófagos) (Amatngalim et al., 2015); lactoferrina (neutrófilos) (Amatngalim et al., 2015); inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora (*Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*, SLPI) (macrófagos) (Amatngalim et al., 2015; Jin et al., 1997; Tomee et al., 1998); elafina (células epiteliales, neutrófilos y macrófagos) (Amatngalim et al., 2015;

Bingle et al., 2001; Pfundt et al., 2000; Torrent et al., 2010); ARNasa 7 (células epiteliales) (Amatngalim et al., 2015; Harder & Schroder, 2002; Torrent et al., 2010; Zhang et al., 2003).

(iii) **Surfactante pulmonar**, formado por una fracción lipídica (~90%), sintetizada por neumocitos tipo II, y compuesta por fosfolípidos (~80-85%) y lípidos neutros (~5-10%) (Bernhard, 2016); y, una fracción proteica (~10%), sintetizada por epitelio bronquial y neumocitos tipo II (Bals & Hiemstra, 2004; Blanco & Perez-Gil, 2007; Mingarro et al., 2008; Ramadas et al., 2009; Rooney et al., 1994). Los fosfolípidos predominantes son fosfatidilcolina (~80%), fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol (~10-15%) y, en menor cantidad, fosfatidiletanolamina (Bernhard, 2016; Glasser & Mallampalli, 2012). La composición de ácidos grasos del surfactante pulmonar incluye ácidos oleico, linoleico y palmítico (Bernhard et al., 2001a; Bernhard et al., 2001b), precursores de eicosanoides o docosahexaenoides, con actividad bactericida y antiinflamatoria, como prostanooides de la serie 2 (prostaglandinas E2 e I2, y tromboxano-A2) y leucotrienos (LT) de serie 4 (LTB₄, LTC₄ y LTD₄) (Wiktorowska-Owczarek et al., 2015).

Las proteínas del surfactante pulmonar (*Surfactant Protein*, SP)-A, SP-B, SP-C y SP-D, son sintetizadas por células del epitelio bronquial y neumocitos tipo II (Bals & Hiemstra, 2004; Ramadas et al., 2009), y participan en el mantenimiento de la estabilidad alveolar, adsorción y redistribución de fosfolípidos del surfactante pulmonar, y la regulación de producción del surfactante (Curstedt & Johansson, 2010; Macfadyen et al., 1998; Mulugeta & Beers, 2006). SP-A y SP-D son proteínas hidrofílicas con actividad bactericida (Wright, 2005), que actúan como opsoninas mediante reconocimiento de PAMPs (PRRs tipo CLR secretadas) (Beharka et al., 2002; Kuroki et al., 2007) de virus, hongos, y bacterias Gram negativas y Gram positivas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*) (Alcorn & Wright, 2004; Kishore et al., 2006; LeVine & Whitsett, 2001; Mason et al., 1998), favoreciendo la fagocitosis y modulando la respuesta inmune. SP-B y SP-C son polipéptidos hidrofóbicos de

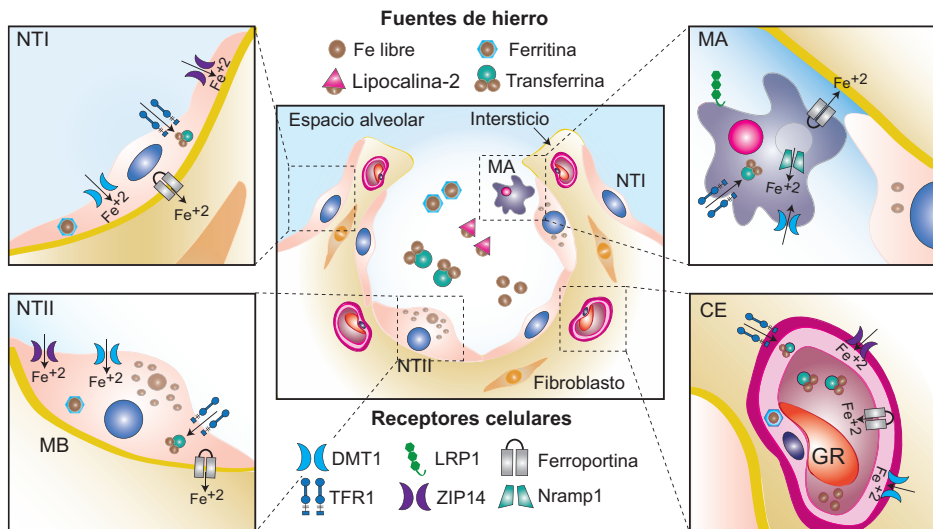
menor tamaño, que interaccionan con la fracción fosfolipídica estabilizando la monocapa del surfactante pulmonar (Blanco & Perez-Gil, 2007; Gomez-Gil et al., 2009; Rooney et al., 1994).

1.3.4. Inmunidad nutricional

Los metales de transición, principalmente manganeso, hierro (Fe), cobalto, níquel, cobre y zinc, son cofactores esenciales para proteínas con funciones estructurales y catalíticas implicadas en procesos biológicos como biosíntesis de precursores, replicación de ADN, transcripción, respiración y respuesta a estrés oxidativo (Lopez & Skaar, 2018). Su concentración se mantiene en equilibrio para evitar deficiencia y toxicidad, y limitar la biodisponibilidad y adquisición por parte de microorganismos patógenos durante los procesos infecciosos. Esta estrategia defensiva forma parte de la inmunidad innata, y se denomina inmunidad nutricional (Lopez & Skaar, 2018; Skaar, 2010).

El Fe es un micronutriente esencial para patógenos y hospedadores. El pulmón humano contiene ~0.4-0.9 miligramos (mg) Fe/gramo (gr) peso seco, localizado principalmente en el tejido pulmonar unido a ferritina (Barberan-García et al., 2015; Fischer et al., 2009; Thompson et al., 1990). Las células humanas importan Fe a través del receptor de transferrina 1 (*Transferrin Receptor 1*, TFR1) (presente en neumocitos tipo I y II, macrófagos alveolares y células endoteliales), del transportador de metal divalente 1 (*Divalent Metal Transporter 1*, DMT1) (neumocitos tipo I y II, macrófagos alveolares), y de la proteína de macrófagos asociada a resistencia natural 1 (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1*, Nramp1) (macrófagos) (Cloonan et al., 2017; Corradi et al., 2009). Los epitelios bronquial y alveolar también expresan otras moléculas de captación de Fe como el transportador ZIP-14 y la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 1 (*low density Lipoprotein Receptor-related Protein 1*, LRP1) (Corradi et al., 2009). Los niveles de Fe libre en pulmón son controlados por un repertorio de proteínas de unión a Fe que incluye transferrina (Cloonan et al., 2017), ferritina (Comeche Casanova et al., 2013), lactoferrina (Martinez et al., 2006), ferroxidasa ceruloplasmina (Boutou

et al., 2013) y el sideróforo lipocalina 2 (Martinez-Rivera et al., 2012), producidos por leucocitos, células epiteliales y/o endoteliales. La exportación de Fe al medio extracelular por leucocitos, epitelio alveolar y macrófagos alveolares se produce través de la proteína transmembrana ferroportina. La expresión de ferroportina está a su vez regulada por la hepcidina, una hormona cuya expresión y producción es inducida por el aumento del Fe sérico; la señalización de proteína morfogénica ósea (*Bone Morphogenic Protein*, BMP); y, por citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-6 e IL-22 (Celli et al., 2004; Ergun & Ergun, 2016) (ver resumen en **Figura 2**).



La homeostasis de Fe intracelular está regulada por las proteínas reguladoras de hierro (*Iron Regulatory Protein*, IRP)-1 e IRP-2, que interactúan con elementos sensibles al hierro (*Iron Responsive Element*, IRE), estructuras localizadas en regiones no traducidas (*Untranslated Regions*, UTR) de los extremos

3' o 5' de los transcritos de ARN mensajero (ARNm) de genes que participan en absorción (TFR1 y DMT1), almacenamiento (ferritina) y exportación (ferroportina) de Fe (Silverberg et al., 2014). Cuando los niveles de Fe intracelular son bajos, las IRPs interaccionan con transcritos con IRE en el extremo 3'UTR (TFR1) estabilizándolos, y con transcritos con IRE en el extremo 5'UTR (ferritina), bloqueando su traducción y provocando el aumento de TFR1 y la disminución de ferritina, respectivamente, lo que favorece la homeostasis de Fe intracelular. Cuando las concentraciones de Fe intracelular son altas, la unión IRP-IRE disminuye, lo que resulta en la reducción de TFR1 y el aumento de ferritina (Muckenthaler et al., 2008).

2. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Según la *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD), la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una enfermedad común, prevenible y tratable, que se caracteriza por síntomas respiratorios persistentes y limitación irreversible del flujo aéreo debida a anomalías de las vías respiratorias y/o alveolares, como consecuencia de una exposición continuada a partículas o gases nocivos. La limitación del flujo aéreo característica en pacientes EPOC se debe a la obstrucción de los bronquios (bronquiolitis obstructiva) y a la destrucción del parénquima pulmonar, lo que provoca un aumento de los espacios alveolares (enfisema). Los síntomas respiratorios más comunes de la EPOC son disnea, tos y producción de esputo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la EPOC afecta al 5% de la población mundial, causó ~3.17 millones de muertes en 2015, y fue la tercera causa de muerte mundial en 2016, tras la cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares. La EPOC ocupa el quinto lugar en términos de morbilidad global, con una prevalencia de ~251 millones de casos en 2016, afectando principalmente a individuos >65 años (Barnes et al., 2015). La EPOC tiene un gran impacto económico en los Sistemas Nacionales de Salud, con costes directos relacionados con la atención de pacientes hospitalizados o ambulatorios, e indirectos relacionados con los años de vida útil perdidos por

absentismo laboral y/o baja productividad. La Sociedad Respiratoria Europea (*European Respiratory Society*, ERS) calcula ~141.4 billones de euros en costes asociados a la EPOC en 2011 (23.3 billones directos, 25.1 billones indirectos y 93.0 billones en valor monetizado perdido del año de vida ajustado por incapacidad), según datos publicados por la OMS (www.erswhitebook.org).

2.1. Factores de riesgo en el desarrollo de EPOC

La EPOC es una enfermedad multifactorial cuya etiología combina factores ambientales y genéticos (Vijayan, 2013). Su principal factor de riesgo es el tabaquismo, con cierto grado de variabilidad entre individuos (Barnes et al., 2015; Burrows et al., 1977). En población no fumadora, el desarrollo de EPOC puede resultar de la exposición continuada y acumulativa a agentes tóxicos particulados, polución ambiental, ocupacional y/o doméstica, hipersensibilidad respiratoria, o un desarrollo pulmonar subóptimo durante la infancia. En general, el desarrollo de la EPOC está relacionado con los siguientes factores:

(i) **Tabaquismo.** Por consumo de cigarrillos, pipa, puros, pipas de agua, etc. así como tabaquismo pasivo.

(ii) **Polución.** Doméstica, por combustión de biomasa para cocinado y calefacción, afectando fundamentalmente al género femenino en países en desarrollo; ocupacional, por inhalación de polvo orgánico e inorgánico, y agentes químicos volátiles; ambiental (Atkinson et al., 2016; Kurmi et al., 2010; Liu et al., 2008).

(iii) **Factores genéticos.** La deficiencia de alfa-1 antitripsina (*Alpha-1 Antitrypsin Deficiency*, AATD) es una enfermedad autosómica recesiva que afecta a 1 de cada 2.000-5.000 personas en Europa, y supone ~1-2% de los casos de EPOC a nivel global (Brashier & Kodgule, 2012; Laurell & Eriksson, 1963; Silverman et al., 1989; Vijayan, 2013). La alfa-1 antitripsina es un inhibidor de proteasas que protege los pulmones del daño proteolítico causado por la elastasa producida por neutrófilos. AATD es causada por polimorfismos en el gen *SERPINA 1* (P1*Z), favorece el desarrollo de enfisema pulmonar como

consecuencia del desequilibrio en la actividad proteolítica/antiproteolítica, y supone un mayor riesgo de desarrollo de EPOC por exposición a humo de tabaco (Brashier & Kodgule, 2012; Laurell & Eriksson, 1963; Silverman et al., 1989; Vijayan, 2013). Por otra parte, existen asociaciones entre los *loci* codificantes de la proteína de interacción de Hedgehog (*HHIP*) y el miembro A de la familia con similitud de secuencia 13 (*FAM13A*), y el desarrollo de fenotipos compatibles con la EPOC (Cho et al., 2010; Cho et al., 2012; Cho et al., 2014; Hancock et al., 2010; Pillai et al., 2009; Repapi et al., 2010; Soler Artigas et al., 2011). Asimismo, existen evidencias de asociación entre polimorfismos en los genes *CHRNA3/5* (receptor colinérgico nicotínico 3/5) (Pillai et al., 2009; Wilk et al., 2012), *IREB2* (proteína de unión a elementos sensibles a Fe^{+2}) (DeMEO et al., 2009), *AGER* (receptor específico de producto final de glicosilación avanzada) (Hancock et al., 2010; Repapi et al., 2010), metaloproteasa (*MMP*)-12, *RIN3* (factor 3 de interacción RAS y RAB) y *TGF-β2* (*Transforming Growth Factor-β2*) (Castaldi et al., 2014), y una mayor susceptibilidad al desarrollo de EPOC.

(iv) **Edad y género.** El envejecimiento de las vías aéreas y el parénquima pulmonar mimetiza algunos cambios estructurales asociados con la progresión de la EPOC (Ito & Barnes, 2009). Si bien su prevalencia es comparable entre hombres y mujeres (Han et al., 2007), existen modelos experimentales que revelan mayor lesión en las vías aéreas en ratones hembra que en ratones macho expuestos a humo de tabaco, en las mismas condiciones (Tam et al., 2016).

(v) **Deficiencias en desarrollo pulmonar.** El desarrollo pulmonar comienza *in utero* y los cambios estructurales más importantes ocurren durante el desarrollo fetal y primeros momentos de vida, cuando el pulmón es altamente susceptible al daño (Quanjer et al., 2010; Quanjer et al., 2012). El tabaquismo durante el embarazo, bajo peso al nacimiento, alteraciones pulmonares en bebés prematuros, y exposición postnatal al humo de tabaco ambiental y/o contaminación, son factores de riesgo asociados al desarrollo de la EPOC (Silverman & Speizer, 1996).

(vi) **Desarrollo socioeconómico.** Existen evidencias de una relación inversa entre desarrollo socioeconómico y riesgo de sufrir EPOC, asociadas al estatus nutricional, hacinamiento, exposición a contaminantes ocupacionales, tabaquismo, neumonías recurrentes durante la niñez, y/o acceso limitado a servicios sanitarios (Lawlor et al., 2004; Shohaimi et al., 2004).

(vii) **Enfermedades respiratorias.** La hiperactividad respiratoria, característica del asma, así como el asma en sí mismo, son factores de riesgo para el desarrollo de EPOC (Silva et al., 2004). Igualmente, la bronquitis crónica está asociada al progreso, severidad y periodos de exacerbación de la EPOC (Corhay et al., 2013).

2.2. Diagnóstico de la EPOC

El diagnóstico de la EPOC se realiza mediante espirometría, que permite medir la capacidad funcional pulmonar de forma no invasiva. El volumen espiratorio forzado (*Forced Expiratory Volume*, FEV_1) equivale al volumen de aire exhalado de manera forzada en el segundo posterior a una inspiración forzada máxima. FEV_1 se expresa en porcentaje, y su valor en individuos sanos corresponde al 75% de la capacidad vital pulmonar (*Forced Vital Capacity*, FVC). Los pacientes EPOC presentan una relación $FEV_1/FVC < 0.7$, que confirma la presencia de limitación del flujo aéreo persistente. La clasificación de la gravedad de la limitación del flujo aéreo en pacientes EPOC ($FEV_1/FVC < 0.7$) se establece en base a FEV_1 posbroncodilatador predicho: GOLD 1 (leve), $FEV_1 \geq 80\%$ del valor predicho; GOLD 2 (moderado), $50\% < FEV_1 < 80\%$ del valor predicho; GOLD 3 (severo), $30\% < FEV_1 < 50\%$ del valor predicho; GOLD 4 (muy severo), $FEV_1 < 30\%$ del valor predicho. Asimismo, varios indicadores clínicos aumentan la probabilidad de un diagnóstico EPOC positivo, incluyendo: disnea progresiva, persistente, y que empeora con el ejercicio; tos crónica; producción de esputo; infección respiratoria recurrente; historial de factores de riesgo.

2.3. Fisiopatología de la EPOC

La EPOC cursa con bronquiolitis obstructiva, enfisema e hipersecreción

mucosa, cuya contribución relativa varía entre individuos (Hogg et al., 2004). La exposición a agentes nocivos induce respuesta inflamatoria y altera la reparación pulmonar, favoreciendo la obstrucción de las vías aéreas y el desarrollo de la enfermedad (Barnes et al., 2015; Spurzem & Rennard, 2005). Características fisiopatológicas de la EPOC (ver resumen en **Figura 3**):

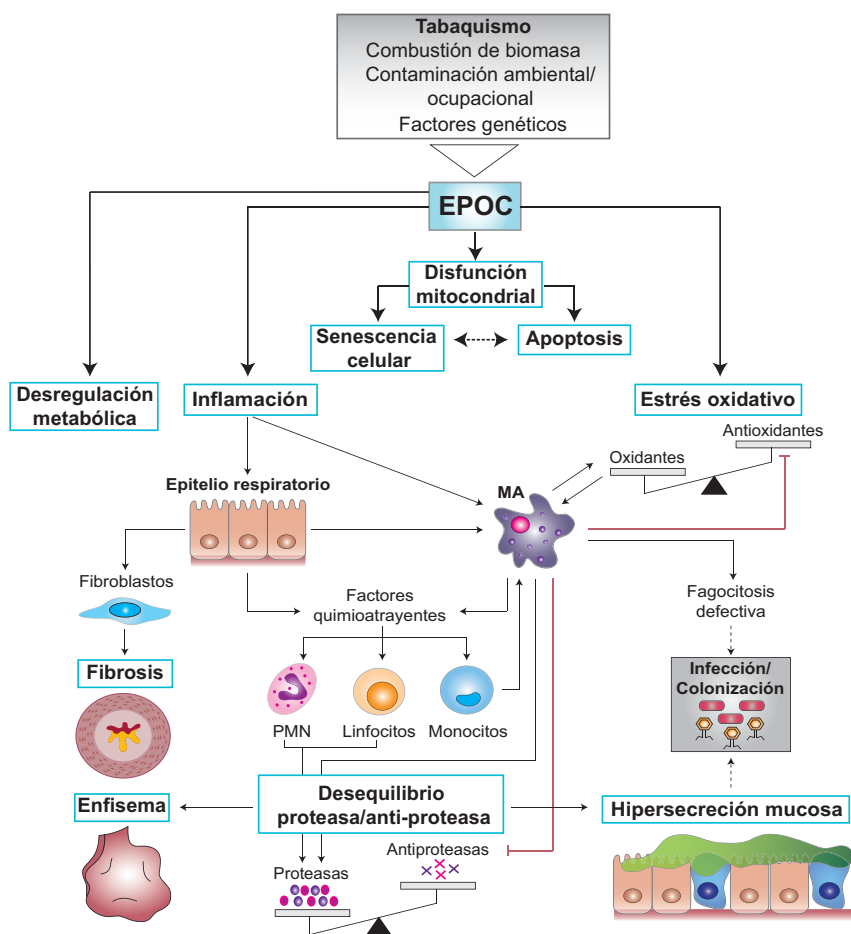


Figura 3. Procesos y elementos implicados en la patogénesis y progresión de la EPOC. El humo de tabaco, así como otros gases y partículas, inducen estrés oxidativo e inflamación, con liberación de mediadores inflamatorios y metaloproteasas responsables de la remodelación de la matriz extracelular (fibrosis), degradación de la pared alveolar (enfisema) debido al desequilibrio de la actividad proteasa/anti-proteasa, e hipersecreción mucosa. Además, el humo de tabaco induce reducción de la biogénesis mitocondrial y disfunción mitocondrial, lo que favorece la apoptosis y senescencia celular, así como alteraciones metabólicas que implican reducción de glicólisis, aumento de oxidación lipídica, y alteración en la homeostasis de Fe en las células epiteliales y macrófagos alveolares, cuya capacidad fagocítica se convierte en deficiente. MA, Macrófago Alveolar; PMN, neutrófilo. Adaptada de (Barnes et al., 2015).

2.3.1. Inflamación crónica

Aparece en vías aéreas periféricas y parénquima pulmonar, y está mediada por:

(i) **Respuesta inmune innata.** Las células epiteliales liberan mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF), y CXCL9, así como mediadores lipídicos (LTB₄) con actividad quimioatrayente de células inflamatorias (Barnes, 2009; Barnes et al., 2015; Barnes, 2016; Di Stefano et al., 2009; Doe et al., 2010; Gao, W. et al., 2015). Por otra parte, el número de macrófagos alveolares aumenta en el espacio alveolar de pacientes EPOC (Barnes, 2009; Barnes et al., 2015; Barnes, 2016). Los macrófagos alveolares están implicados en: (a) liberación de TNF- α , proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), y factores quimiotácticos de neutrófilos (IL-8, entre otros) (Barnes et al., 2003), mediada por la activación de NF- κ B (Anto et al., 2002; Caramori et al., 2003; Di Stefano et al., 2002), y la tirosina quinasa Src (Geraghty et al., 2014; Walters et al., 2005); (b) liberación de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) que contribuyen al proceso inflamatorio, estrés oxidativo y senescencia celular; (c) secreción de enzimas proteolíticas (MMP-9, MMP-12, catepsinas L, S, K), implicadas en la degradación de fibras elásticas y remodelación de la matriz extracelular (*Extracellular matrix*, ECM) (Punturieri et al., 2000; Russell et al., 2002). Sin embargo, los macrófagos alveolares de pacientes EPOC presentan alteraciones en su capacidad fagocítica debido a la interferencia de la exposición a humo de tabaco con varias cascadas de señalización celular (PRRs: TLR2, TLR4, TLR9; eje PI3K-AKT), lo que a su vez favorece la colonización por patógenos bacterianos como *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis* o *S. pneumoniae* (Berenson et al., 2014; Berenson et al., 2015; Hodge et al., 2003; Marti-Lliteras et al., 2009). A su vez, los neutrófilos se encuentran en cantidad significativa en lavado broncoalveolar (LBA) y esputo de pacientes EPOC (Ravi et al., 2014). Son atraídos, entre otros, por IL-8 y LTB₄ (Barnett et al., 1993; Kreisle & Parker, 1983; Reilly et al., 1988), y están involucrados en procesos proteolíticos

mediante liberación de proteasas y péptidos catiónicos que degradan las fibras de colágeno en fragmentos con capacidad quimioatrayente, contribuyendo así a la cronificación del proceso inflamatorio (Overbeek et al., 2013).

Por último, el humo de tabaco estimula la vía alternativa del complemento y el aumento de los niveles séricos de C3a y C5a (Chauhan et al., 1990; Kew et al., 1985; Kosmas et al., 1997; Marc et al., 2004), induciendo la expresión de moléculas de adhesión en células epiteliales que, a su vez, facilitan el reclutamiento de células inflamatorias (Floreani et al., 2003; Koethe et al., 1995). Existe un aumento de péptidos y proteínas antimicrobianas pulmonares (lisozima, lactoferrina, SLPI, LL-37, SP-A y SP-D) en la fase estable, y de LL-37 durante los periodos de exacerbación de la enfermedad, si bien los niveles de β -defensinas disminuyen por el efecto del humo de tabaco a largo plazo (Lecaille et al., 2016; Parameswaran et al., 2011; Xiao et al., 2005).

(ii) **Respuesta inmune adaptativa.** Ocurre con el progreso de la enfermedad y se relaciona con un aumento de linfocitos T CD8+ citotóxicos, implicados en daño celular por liberación de perforina y granzima B (Mikko et al., 2013); de linfocitos CD4+ Th1 y Th17, con actividad proinflamatoria (Saetta et al., 2003); y, de linfocitos B.

2.3.2. Estrés oxidativo

Aparece aumentado en pacientes EPOC por el reclutamiento y activación de células inflamatorias, y por los agentes oxidantes presentes en el humo de tabaco que dañan el tejido respiratorio, inactivan los mecanismos de defensa pulmonar, e inician el proceso inflamatorio (Barnes, 2014; Barnes, 2016; Fischer et al., 2015). Las ROS actúan a varios niveles: (i) activan NF- κ B y MAPK, favoreciendo la transcripción de genes proinflamatorios y la secreción de proteasas; (ii) activan TGF- β 2, estimulando la fibrosis de las vías aéreas; (iii) favorecen la producción de moco por aumento de la expresión de *MUC5AC* a través de un mecanismo dependiente de NADPH oxidorreductasa 4 (NOX4) (Kim et al., 2008); (iv) reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados (peroxidación lipídica) produciendo

hidroperóxidos, endoperóxidos, aldehídos (malondialdehído) y alcanos (etano y pentano) (Kluchova et al., 2007). De forma concomitante, el tabaquismo reduce los niveles de agentes antioxidantes sistémicos, como la vitamina E y el ácido ascórbico (Duthie et al., 1991); interfiere con el metabolismo de glutatión, disminuyendo sus niveles intracelulares en células epiteliales y aumentando los niveles de glutatión reducido en el LBA de fumadores crónicos (Cantin et al., 1987; Li et al., 1994); y reduce la expresión del Factor Nuclear Eritroide 2 (*Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2*, Nrf2), que está implicado en la activación de genes citoprotectores y antioxidantes (Malhotra et al., 2009; Vucic et al., 2014). El cese del tabaquismo no revierte el estrés oxidativo pulmonar, sugiriendo que las partículas retenidas siguen contribuyendo a la generación de agentes oxidantes (Louhelainen et al., 2009).

2.3.3. Actividad proteolítica

Está favorecida por el elevado número de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T CD8⁺ residentes en las vías áreas bajas y los espacios alveolares de pacientes EPOC, que liberan enzimas proteolíticas como son la elastasa neutrofílica, proteinasa 3, catepsinas (G, B, S, H, L), trombina, plasmina, caspasa y MMPs (MMP-9 y MMP-12) (Houghton, 2012; Owen, 2005). Además, las ROS inactivan el inhibidor tisular de metaloproteasas (*Tissue Inhibitor of Matrix Metaloproteinase*, TIMPs) y la alfa-1 antitripsina favoreciendo, a su vez, el desequilibrio de la actividad proteolítica/antiproteolítica, y contribuyendo a la destrucción del tejido pulmonar provocando enfisema (Shapiro et al., 2003).

2.3.4. Hipersecreción mucosa

Es resultado de la exposición al humo de tabaco (Deshmukh et al., 2005; Ebert & Terracio, 1975), infecciones víricas agudas (Holtzman et al., 2005), y/o infecciones bacterianas (Burgel & Nadel, 2004). El humo de tabaco induce el reemplazo del epitelio pseudoestratificado ciliado por células caliciformes, la hipertrofia de las glándulas mucosas, y la producción de MUC5A, por activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*,

EGF) (Reid, 1960; Takeyama et al., 2001). La sobreproducción de moco se agrava por pérdida del epitelio ciliado, alteración de batido ciliar (Auerbach et al., 1957; Leopold et al., 2009), oclusión de las vías aéreas distales, y tos ineficaz por debilidad de los músculos respiratorios y disminución de flujo espiratorio máximo (Burgel & Nadel, 2004; Hogg et al., 2004; Verra et al., 1995).

2.3.5. Remodelación de ECM

Se caracteriza por recambio y/o degradación de colágeno y elastina (60% y 24% de ECM respiratoria en individuos sanos, respectivamente) (Lang et al., 1994; Rucker & Dubick, 1984; Starcher & Galione, 1976). Los macrófagos y neutrófilos liberan enzimas proteolíticas (MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-12, prolil-endopeptidasas, elastasa neutrofilica) responsables del procesamiento de colágeno y elastina a matricinas y elastocinas, respectivamente (Gaggar et al., 2008; Gu et al., 2018; O'Reilly et al., 2009). Las matricinas Prolina-Glicina-Prolina (PGP) y PGP-acetilada (Ac-PGP) presentan propiedades quimiotácticas de neutrófilos por interacción con los receptores CXCR1 y CXCR2, contribuyendo a la perpetuación de la respuesta inflamatoria pulmonar (Gaggar et al., 2008; O'Reilly et al., 2009). Las elastocinas favorecen el reclutamiento de monocitos al pulmón, que se diferencian en macrófagos y liberan MMP-12 inactivando la alfa-1 antitripsina, cuya deficiencia se asocia con el desarrollo temprano de enfisema (Hautamaki et al., 1997); así como la expresión de NAPDH oxidorreductasa (NOX2) en macrófagos, responsable de la inhibición de la proteína deacetilasa Sirtuina 1, que actúa como regulador negativo de MMP-9 en neutrófilos y macrófagos (Trocme et al., 2015). Además, la elastasa neutrofilica aumenta la disponibilidad de EGF para los fibroblastos, inhibiendo la producción de TGF- β 2 y la síntesis de tropoelastina, lo que se traduce en una reducción de la biogénesis *de novo* de fibras de elastina (DiCamillo et al., 2002; DiCamillo et al., 2006; Yang et al., 2008). Este hecho, junto con la reducción de colágeno total tisular, el aumento relativo de colágeno III/colágeno I, y la deposición anormal de colágeno en las vías aéreas, compromete la reparación pulmonar y favorece el estrechamiento de los bronquiolos terminales provocando fibrosis (Hogg et al., 2009).

2.3.6. Alteración metabólica

Afecta principalmente a las células epiteliales, donde se ha descrito un descenso de la glicólisis y la respiración mitocondrial, y un incremento de la ruta de las pentosas fosfato y la oxidación de ácidos grasos (Agarwal et al., 2012; Agarwal et al., 2014; Mannam et al., 2016). Además, la fracción particulada del humo de tabaco altera la homeostasis de Fe pulmonar, y contribuye a la generación de radicales libres (Fischer et al., 2015). Los pacientes EPOC presentan: (i) mayor cantidad de proteínas de unión a Fe (ferritina, transferrina, lactoferrina, haptoglobina y lipocalina 2) (Eagan et al., 2010; Engstrom et al., 2009; Philippot et al., 2014; Tandara et al., 2015); (ii) macrófagos alveolares con alta carga de Fe intracelular, lo que estimula la liberación de IL-8 e IL-1 β , contribuyendo al proceso inflamatorio, estrés oxidativo, apoptosis y fibrosis; (iii) polimorfismos y aumento de expresión de genes implicados en la regulación de Fe (Chappell et al., 2011; Cloonan et al., 2017; DeMeo et al., 2009; Philippot et al., 2014; Pillai et al., 2009; Tandara et al., 2015).

2.3.7. Disfunción mitocondrial y senescencia celular

Es resultado de la combinación de estrés oxidativo, inflamación, senescencia y apoptosis celular, e incluye dos procesos: disminución de biogénesis mitocondrial en células del músculo liso de la pared alveolar (Gosker et al., 2003; Gosker et al., 2006), y mitofagia disfuncional o degradación incompleta de las mitocondrias dañadas (Ahmad et al., 2015; Ito et al., 2015), lo que favorece la acumulación de restos mitocondriales en la región perinuclear generando ROS mitocondriales, daño del ADN nuclear (senescencia celular), liberación del ADN mitocondrial en el citosol, y activación de PRRs y respuestas inflamatorias dependientes de inflamasoma (Zhang et al., 2018). La senescencia prematura de células epiteliales, fibroblastos y endotelio pulmonar (Muller et al., 2006; Tsuji et al., 2006), relacionada con el daño del ADN celular inducido por estrés oxidativo, favorece la activación de p53/p21 y p16/pRB, desencadenando alteraciones epigenéticas, disfunción mitocondrial, pérdida de homeostasis proteica o proteostasis (autofagia, mitofagia), e inestabilidad

genómica (Lopez-Otin et al., 2013). Las células senescentes presentan menor capacidad para la reparación del epitelio dañado y secreción aberrante de citocinas, lo que es conocido como fenotipo secretor asociado a la senescencia en EPOC (*Senescence Associated Secretary Phenotype*, SASP) responsable, a su vez, de la inducción de senescencia en las células colindantes (Chilosi et al., 2013; Coppe et al., 2010).

2.4. Fases cíclicas en la progresión de la EPOC: fase estable y exacerbación

En los pacientes EPOC, la enfermedad transita de forma cíclica entre la fase estable y la fase de agudización periódica o exacerbación. Las exacerbaciones son procesos de agudización de los síntomas respiratorios de la enfermedad (disnea, tos y producción de esputo purulento), asociadas con un aumento de la inflamación respiratoria y sistémica (Wedzicha et al., 2014). Constituyen la principal fuente de morbilidad y mortalidad de la EPOC, y aceleran la pérdida de la función pulmonar (Donaldson et al., 2002). Las exacerbaciones son causadas por contaminantes ambientales, virus y/o bacterias, si bien un tercio de las mismas son de origen desconocido (Mackay & Hurst, 2013). La frecuencia de las exacerbaciones condiciona el estado del paciente y la progresión de la patología. Los pacientes “exacerbadores frecuentes” presentan peor pronóstico, mayor riesgo de hospitalización y peor calidad de vida que los que mantienen la enfermedad en fase estable de forma prolongada (Hurst et al., 2010; Seemungal et al., 1998; Soler Artigas et al., 2011).

Las exacerbaciones víricas son estacionales y cursan con presentaciones severas y recuperaciones largas (Seemungal et al., 2001). Los virus más frecuentemente identificados en muestras de LBA de pacientes EPOC son rinovirus (~24-36%), influenza A (~25-31%) y Virus Respiratorio Sinticial (VRS) (~18-22%) (Biancardi et al., 2016; Greenberg et al., 2000; Rohde et al., 2003; Walsh et al., 1999; Wilkinson et al., 2017); y en menor medida, parainfluenza (~3-6%), metapneumovirus humano (<2%), coronavirus (~0.4-2.7%) y adenovirus (~2-5.8%) (Wu, X. et al., 2014; Zwaans et al., 2014). Estos virus pueden aparecer en coinfección con otros virus (influenza A/

rinovirus/coronavirus; VRS/coronavirus; rinovirus/coronavirus), bacterias (*P. aeruginosa*, ~31%; *H. influenzae*, ~23%), u hongos (*Aspergillus spp.*, ~23%) (Biancardi et al., 2016; Koul et al., 2017; Wilkinson et al., 2017).

Por otra parte, el diagnóstico microbiológico de muestras de esputo de pacientes EPOC mediante cultivo bacteriano convencional determina que ~50% de las exacerbaciones son producidas por bacterias (Sethi et al., 2016; Wilkinson et al., 2017), asociadas con perturbaciones del microbioma pulmonar, y consistentes en aumento de la carga bacteriana y descenso de la diversidad (Sethi et al., 2002; Wang et al., 2017; Wilkinson et al., 2017). Las bacterias más frecuentemente aisladas en muestras de pacientes EPOC en fase estable son, en orden decreciente: *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* y *P. aeruginosa* (Monso et al., 1995; Murphy & Sethi, 1992; Wilkinson et al., 2017). En los procesos de agudización, se observa un descenso de α -proteobacterias y Firmicutes, y un aumento de γ -proteobacterias, traducido en un descenso de *Streptococcus spp.* y un aumento de *H. influenzae*, *M. catarrhalis* y *P. aeruginosa* (Wang et al., 2017). *H. influenzae* es responsable de ~20-30% de las exacerbaciones agudas (Finney et al., 2014; King, 2012; Sethi & Murphy, 2008), relacionadas con la adquisición de cepas nuevas o la colonización por cepas preexistentes (Sethi et al., 2002).

La colonización-persistencia de patógenos oportunistas en las vías respiratorias bajas de pacientes EPOC aumenta los síntomas en fase estable y la frecuencia de exacerbaciones de naturaleza microbiana. Este concepto se ilustra mediante la *hipótesis del círculo vicioso*: la exposición continuada a contaminantes inhalados, como el humo de tabaco, compromete la inmunidad pulmonar permitiendo el acceso y establecimiento de poblaciones bacterianas colonizadoras en el tracto respiratorio inferior de pacientes EPOC. Esta colonización es, a su vez, un estímulo inflamatorio que amplifica, contribuye y perpetúa la inflamación crónica, la obstrucción de vías aéreas (Sethi & Murphy, 2001), la progresión del daño pulmonar y por tanto, favorece la progresión de la EPOC (Drannik et al., 2004; Sethi & Murphy, 2008; Sethi et al., 2008). Este círculo vicioso de infección e inflamación crónica es responsable del deterioro de

la función pulmonar característica en pacientes EPOC, incluso tras el cese de la exposición a humo de tabaco (Mammen & Sethi, 2016; Sze et al., 2012) (**Figura 4**).

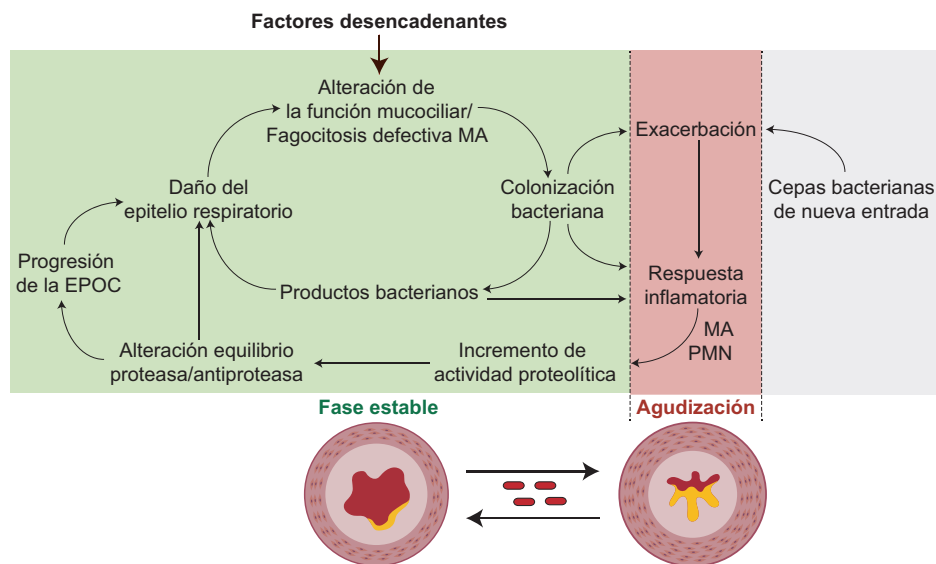


Figura 4. Hipótesis del círculo vicioso en la progresión de la EPOC. La agresión externa pulmonar daña elementos humorales y celulares de la inmunidad respiratoria, lo que facilita la colonización pulmonar por patógenos oportunistas. Esta colonización persistente provoca una secuencia cíclica de eventos que contribuyen de forma progresiva a la inflamación crónica y el daño tisular observados en pacientes EPOC, aumentando los síntomas en fase estable y la frecuencia de exacerbaciones que, en conjunto, contribuyen a la progresión irreversible de la enfermedad. MA, Macrófago Alveolar; PMN, neutrófilo. Adaptada de (Sethi & Murphy, 2001).

2.5. Tratamiento de la EPOC

Como medidas generales, se recomienda el abandono del tabaco, adecuación de la nutrición, actividad física regular y evaluación-tratamiento de comorbilidades asociadas (Barnes et al., 2015; Viniol & Vogelmeier, 2018). Dada su irreversibilidad, el tratamiento de la EPOC es paliativo, y en función de la fase y la sintomatología, las pautas a seguir son:

(i) **Tratamiento de la fase estable.** Se recomienda la administración de broncodilatadores y antiinflamatorios para reducir la sintomatología, mejorar la tolerancia al ejercicio y prevenir la progresión y frecuencia de exacerbaciones. Se recomiendan broncodilatadores de larga duración (β 2-agonistas, LABA;

antagonistas del receptor muscarínico, LAMA) en monoterapia, o en combinación LABA+LAMA, en pacientes con disnea persistente y falta de respuesta a la monoterapia (van Noord et al., 2005; van Noord et al., 2010). Como antiinflamatorios, se prescriben corticoides inhalados (CI) e inhibidores de fosfodiesterasa 4 (PDE4_i), frecuentemente en combinación con broncodilatadores (Siddiqui et al., 2015). Asimismo, se recomienda oxigenoterapia durante al menos 15 h/día (Guía Española de la EPOC, GesEPOC, 2017; y (Vestbo et al., 2013)).

(ii) **Tratamiento de las exacerbaciones.** Tiene como objetivo la reducción de la sintomatología asociada a los periodos de agudización, y la prevención de exacerbaciones posteriores. Incluye broncodilatadores de corta duración β 2-agonistas (SABA), seguido de broncodilatadores de larga duración en pacientes estabilizados; corticoides orales (5-7 días), en pacientes con presencia de eosinófilos en sangre; antibióticos, amoxicilina o doxiciclina, en caso de infección bacteriana (esputo purulento); oxigenoterapia (Guía Española de la EPOC, GesEPOC 2017; y (Barnes et al., 2015)).

(iii) **Prevención de las exacerbaciones.** Se recomienda vacunación anual antigripal (reducción de exacerbaciones ~27%) y antineumocócica (Poole et al., 2006; Walters et al., 2017). Asimismo, está indicada: (a) la monoterapia con LABA o LAMA (reducción de exacerbaciones ~25%); (b) la combinación LABA+CI o LAMA+LABA+CI; (c) el PDE4_i Roflumilast (reducción de exacerbaciones ~17%), en pacientes con bronquitis crónica concomitante y EPOC GOLD 3 ó 4 con historial de exacerbaciones frecuentes (Calverley et al., 2007; Calverley et al., 2009); (d) los mucolíticos (N-acetilcisteína y carbosciteína), en pacientes agudizadores con bronquitis crónica (Zheng et al., 2008); (e) la profilaxis antibiótica oral con macrólidos y fluoroquinolonas en dosis bajas (Herath & Poole, 2013; Sethi et al., 2010), en pacientes GOLD 2-4 e historial de agudizaciones frecuentes (Herath & Poole, 2013; Sethi et al., 2010; Wedzicha et al., 2017). La profilaxis antibiótica reduce la incidencia de exacerbaciones y los tiempos de recuperación, si bien aumenta el riesgo de generación y transmisión de resistencias (Albert et al., 2011; Seemungal et al.,

2008; Serisier, 2013).

2.6. Utilización de modelos de experimentación animal en el estudio de la fisiopatología de la EPOC

Se han desarrollado varios modelos de experimentación animal para el estudio de las bases de la patobiología de la EPOC (Ghorani et al., 2017; Jones et al., 2017; Vlahos et al., 2006). Estos modelos implican el uso de distintas estirpes de ratón y rata, así como cobaya, hurón, perro o mono (Ghorani et al., 2017; Jones et al., 2017; Vlahos et al., 2006). Entre ellos, el modelo murino presenta ventajas económicas y técnicas (fácil manejo y estabulación, acceso a cepas modificadas genéticamente, información genética y panel extenso de herramientas moleculares e inmunológicas disponibles). Existen varias estrategias de inducción de la lesión pulmonar, entre las que se incluyen:

(i) **Exposición a humo de tabaco.** Este procedimiento induce infiltración pulmonar de macrófagos y neutrófilos, reclutamiento de linfocitos T CD4+ y CD8+, enfisema, hipersecreción mucosa, remodelado de vías aéreas y cambios en la función pulmonar (Bracke et al., 2007; Churg et al., 2008; Pera et al., 2011). Presenta tres factores limitantes: (a) no existe un protocolo estandarizado en cuanto al tipo de cigarrillo (comercial o de investigación; con o sin filtro), administración (exposición corporal completa o nasal), y dosis; (b) requiere periodos de exposición largos; (c) no permite mimetizar estadios de EPOC severa (GOLD 3) (Eltom et al., 2013; Ghorani et al., 2017; O'Byrne & Postma, 1999; Vlahos et al., 2006). Se ha utilizado en ratón (**Tabla 1**), cobaya y rata (Ghorani et al., 2017; Groneberg & Chung, 2004; Jones et al., 2017; Leberl et al., 2013; Vlahos et al., 2006).

(ii) **Exposición a contaminantes ambientales** (material particulado urbano, ozono o la combinación de ambos), aplicado en cobaya, rata y ratón para el estudio de la contribución de la contaminación aérea al desarrollo de la EPOC, evaluando principalmente el efecto de la exposición aguda o crónica a ozono (Jones et al., 2017; Miyabara et al., 1998). Estos procedimientos inducen estrés

oxidativo, inflamación pulmonar, metaplasia de células caliciformes y alteración de la función pulmonar (Hirota et al., 2012; Li et al., 2009).

(iii) **Administración de enzimas proteolíticas**, incluyendo elastasa porcina pancreática (EPP), elastasa neutrofilica humana y papaína en ratón (**Tabla 1**), rata y hámster (Jones et al., 2017; Wright & Churg, 2008). Estos procedimientos generan aumento de los espacios alveolares (enfisema) por degradación de las fibras elásticas, e inflamación pulmonar y sistémica (Antunes & Rocco, 2011; Artachevarria et al., 2010; Artachevarria et al., 2011; Pera et al., 2011; Snider et al., 1986); sin embargo, no induce fibrosis e hipersecreción mucosa. La lesión es generada con una única administración, y el grado es modulable mediante el ajuste de la cantidad de enzima administrada (Antunes & Rocco, 2011; Jones et al., 2017; Wright & Churg, 2008; Wright et al., 2008).

Tabla 1. Métodos utilizados para inducción de lesiones compatibles con la EPOC en ratón.

Inductor	Método	Estirpe	Referencia
Humo de tabaco	2 exposiciones x 75 min ¹ /día, 5 días/sem ² , durante 1-12 sem, exposición nasal	BALB/c	(Beckett et al., 2013)
	2 exposiciones x 30 min/día, 3 días consecutivos, exposición cuerpo completo	BALB/c	(Hardaker et al., 2010)
	2 exposiciones x 12 cigarrillos (sin filtro) x 50 min/día, 5 días/sem, 8 ó 24 sem, exposición cuerpo completo	BALB/c	(Jobse et al., 2013)
	4 exposiciones x 5 cigarrillos/día, 5 días/sem, durante 24 sem, exposición no detallada	BALB/c	(Duan et al., 2013)
	2 exposiciones x 50 min/día, 3 días consecutivos, exposición cuerpo completo	C57BL/6	(John et al., 2014)
	5 cigarrillos/día, 5 días/sem, durante 6 meses, exposición nasal	eNOS/-	(Wright et al., 2012)
	5 h/día, 5 días/sem, durante 6 meses, exposición cuerpo completo	129S6	(Cremona et al., 2013)
	4 h/día, 5 días/sem durante 6 meses, exposición cuerpo completo	C57BL/6J	(Wortham et al., 2012)
	3 cigarrillos (con filtro), 5 días/sem, durante 6 meses, exposición nasal	C57BL/6	(Zhou et al., 2013)
	10 cigarrillos (sin filtro), 50 min/día, 5días/sem, durante 22, 24 y 45 días, exposición nasal	C57BL/6	(Tanabe et al., 2013)
	3 cigarrillos/día, 5 días/sem, durante 4 ó 7 meses	C57BL/6	(Cavarra et al., 2001)
	6 h/día, 7 días/sem, exposición cuerpo completo	BALB/c	(Barrett et al., 2002)
	EPP ³	1.2 U ⁴ EPP, 1 día/sem, 4 sem consecutivas, administración intranasal	BALB/c
2 U EPP, 1 dosis, administración intratraqueal		C57BL/6J	(Vidal et al., 2012)
6 U EPP, 1 dosis, administración intratraqueal		A/J	(Artachevarria et al., 2010; Artachevarria et al., 2011)
4 U EPP, 1 dosis/sem, 3 semanas consecutivas, administración intratraqueal		A/J	(Munoz-Barrutia et al., 2012)
1 U EPP, 1 dosis, administración intratraqueal		BALB/c y C57BL/6	(Dharwal & Naura, 2018)

¹Min, minuto; ²Sem, semana; ³EPP, Elastasa Porcina Pancreática; ⁴U, unidades

(iv) **Exposición crónica a LPS** en hámster, rata y ratón, induce inflamación pulmonar, hiperactividad aérea y cambios estructurales en pulmón (Brass et al., 2008; Toward & Broadley, 2000).

Por otro lado, existen varias estrategias que mimetizan procesos de exacerbación, empleadas en el estudio de mecanismos patogénicos, biomarcadores y/o dianas terapéuticas (Ghorani et al., 2017; Jones et al., 2017; Vlahos et al., 2006), resumidas como sigue:

(i) **Administración de LPS bacteriano**, en combinación con humo de tabaco, generando enfisema, fiebre, hipersecreción mucosa y broncoconstricción (Spond et al., 2004); o en combinación con EPP, generando hiperplasia de células mucosas y aumento de espacios alveolares (Stolk et al., 1992). Ha sido utilizado en ratón, rata y cobaya (Baarsma et al., 2013; Hardaker et al., 2012; Sohn et al., 2013).

(ii) **Infección respiratoria con virus**, principalmente Influenza A, en ratones previamente expuestos a humo de tabaco, generando un proceso inflamatorio pulmonar y sistémico agudo (Zhou et al., 2013), e incremento de la replicación viral (Beckett et al., 2013), que favorece la progresión del enfisema y la alteración de las vías aéreas.

(iii) **Infección respiratoria con patógenos bacterianos** como *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, o *H. influenzae* (Drannik et al., 2004; Huvenne et al., 2011). En este último caso, en ratones con función pulmonar normal o previamente expuestos a humo de tabaco, induce respuesta inflamatoria intensa y daño pulmonar (Gaschler et al., 2009; Gaschler et al., 2010).

La implementación y caracterización dual (hospedador y patógeno) de un modelo murino de pulmón enfisematoso inducido por instilación intratraqueal de EPP y exacerbación mediante infección aguda por *H. influenzae*, ha sido objeto de estudio en el Capítulo 3 de este trabajo de Tesis Doctoral.

3. *Haemophilus influenzae*: comensal y patógeno oportunista respiratorio humano

H. influenzae es un cocobacilo Gram negativo pleomórfico. Pertenece al filo Proteobacteria, clase γ -proteobacteria, orden Pasteurellales, familia Pasteurellaceae. Es anaerobio facultativo y presenta requerimientos nutricionales consistentes en Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido (NAD) (factor V), y hemina (factor X), éste último únicamente en aerobiosis. *H. influenzae* es miembro habitual del microbioma nasofaríngeo humano en individuos sanos, y un patógeno oportunista causante de infección aguda o crónica en individuos inmunocomprometidos (Agrawal & Murphy, 2011).

Las cepas de *H. influenzae* se dividen en tipificables y no tipificables, en función de la presencia o ausencia de cápsula polisacáridica, respectivamente. Las cepas tipificables se clasifican en seis serotipos (a-f) en función de su antígeno capsular (Kirkman & Crawford, 1971). *H. influenzae* serotipo b (Hib) fue el serotipo más abundante, causante de septicemia, meningitis, epiglotitis y neumonía aguda hasta la implementación de una vacuna eficiente en la década de los años 90 del siglo XX (Peltola, 2000; Tudor-Williams et al., 1989). El éxito de esta vacuna provocó la disminución de la prevalencia de cepas tipificables y el aumento de cepas no tipificables (*H. influenzae* no tipificable, HiNT). HiNT coloniza nichos contiguos (oído medio, conjuntiva, senos nasales) siendo agente etiológico de procesos infecciosos como otitis media, conjuntivitis aguda o sinusitis; asimismo, accede a las vías respiratorias bajas, causando traqueítis, neumonía y aproximadamente, ~20-30% de las exacerbaciones en pacientes EPOC (King, 2012).

3.1. Tratamiento de la infección por *H. influenzae*

La ausencia de vacunas eficaces frente a cepas descapsuladas de *H. influenzae* determina la necesidad de utilizar antibióticos como tratamiento, cuya elección depende del tipo de proceso infeccioso, edad del paciente, presencia de comorbilidades e historial de tratamiento previo. Los antibióticos más utilizados

son β -lactámicos, macrólidos, quinolonas, fenicoles y antagonistas de folato (Tristram et al., 2007). En contrapartida, el uso de antibióticos favorece la aparición de resistencias en HiNT y el consiguiente fallo terapéutico. La Lista Global de Patógenos Prioritarios (*Global Priority Pathogen List*) de la OMS incluye *H. influenzae* resistente a ampicilina como una prioridad sanitaria tipo tres (nivel medio) (<http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>). La resistencia a la ampicilina varía entre ~10-60% de los aislados clínicos, dependiendo de la región geográfica, y está mediada por la hidrólisis enzimática del anillo lactámico por β -lactamasas, y la modificación de proteínas de unión a penicilinas (*Penicillin Binding Proteins*, PBP) (Abdel-Rahman et al., 2000; Kaczmarek et al., 2004; Mansson et al., 2017). El macrólido azitromicina (AZM) es utilizado como profiláctico en pacientes con EPOC moderada-severa por su efecto inmunomodulador (Wedzicha et al., 2017). Sin embargo, la AZM aumenta el riesgo de infecciones pulmonares por patógenos respiratorios resistentes a macrólidos, e induce resistencia en HiNT (Euba et al., 2015b; Hare et al., 2013; Serisier, 2013; Tsuji et al., 2018). El cotrimoxazol (TxS), combinación de trimetoprim (TMP) y sulfametoxazol (SMX), es un antagonista de ácido fólico, que interfiere con el metabolismo y la replicación bacteriana bloqueando la producción de ácido tetrahidrofólico (ATHF), precursor de timidina. Existen evidencias que relacionan la resistencia de *H. influenzae* a TMP con la generación reversible de auxotrofia a timidina en cepas aisladas de esputo de pacientes con bronquitis crónica previamente tratados con TMP (Platt et al., 1983).

La caracterización del papel de la auxotrofia a timidina por inactivación de la enzima timidilato sintetasa en la resistencia antibiótica de HiNT, y su impacto en la interacción patógeno-sistema respiratorio, ha sido objeto de estudio en el Capítulo 2 de este trabajo de Tesis Doctoral.

3.2. Mecanismos moleculares de variación genómica de *H. influenzae*

HiNT es un patógeno oportunista bien adaptado al tracto respiratorio humano, cuya plasticidad genómica facilita un alto grado de variación

antigénica y fenotípica que, a su vez, favorece el escape de la respuesta inmune respiratoria (Foxwell et al., 1998; Moxon et al., 1994; Pettigrew et al., 2018). La secuenciación de genomas completos de cepas de HiNT aisladas de muestras respiratorias de pacientes EPOC recogidas de forma longitudinal, en fase estable o exacerbación, muestra la diversidad genómica existente, así como la presencia de rasgos genómicos de patoadaptación y evolución paralela (De Chiara et al., 2014; Garmendia et al., 2014; Moleres et al., 2018; Pettigrew et al., 2018).

Los mecanismos responsables de la variación genómica y patoadaptación, incluyen: (i) captación de ADN exógeno e integración cromosómica mediante **competencia natural y doble recombinación homóloga**, en condiciones de restricción nutricional (Findlay & Redfield, 2009; Maughan & Redfield, 2009; Mell et al., 2011; Mell et al., 2012; Mell et al., 2016; Sinha et al., 2013); (ii) **variación de fase**, que puede ocurrir en la región promotora o codificante de genes de virulencia (adhesinas: genes *hifA*, *hmw1A*, *hmw2A*; lipopoligosacárido, LOS: genes *lic1A*, *lic2A*, *lic3A*, *oafA*, *lex2A*, *lgtC*; captación de Fe-hemina: genes *hgpA*, *hgpB*, *hgpC*, *tbpB*) (Ahmad et al., 2017; Cholon et al., 2008; Dawid et al., 1999; Gilsdorf et al., 2004; Hood et al., 1996; Moxon et al., 2006; Power et al., 2009; van Ham et al., 1994; Weiser, 2000); (iii) **polimorfismos** (Moleres et al., 2018; Pettigrew et al., 2018); (iv) **hipermutación**, en cepas de HiNT persistentes aisladas de pacientes con fibrosis quística, y resistentes a antibióticos β -lactámicos, asociada a polimorfismos en el gen *mutS* (Jolivet-Gougeon et al., 2011; Oliver & Mena, 2010; Roman et al., 2004; Watson et al., 2004).

3.3. Estrategias de persistencia y virulencia de *H. influenzae*

3.3.1. Evasión de factores solubles del sistema inmune

(i) **Evasión del sistema de complemento.** HiNT interacciona con C4BP, Factor H y vitronectina, inhibiendo el sistema del complemento y la opsonización por proteínas formadoras de poros implicadas en lisis celular (Hallstrom et al., 2007; Hallstrom et al., 2008; Hallstrom & Riesbeck, 2010; Langereis et

al., 2014; Wong et al., 2011) (**Figura 5**). Además, HiNT retrasa la actividad convertasa y la deposición de C3b sobre la superficie bacteriana (Williams et al., 2001). Esta evasión está facilitada por la decoración de la molécula de LOS de HiNT con galactosa, ácido siálico o fosforilcolina (ChoP) (Severi et al., 2005; Severi et al., 2007; Weiser et al., 1997). Estas modificaciones mimetizan moléculas eucariotas favoreciendo, además, la resistencia sérica (Ikeda et al., 2015). Sin embargo, ChoP es reconocida por la proteína C-reactiva (*C-Reactive Protein*, CRP), activadora de la vía clásica del complemento (Gould & Weiser, 2002). La variación de fase del operón *licIABCD*, responsable de la decoración del LOS con ChoP, modula los niveles superficiales de esta molécula y, por tanto, su capacidad para provocar enfermedad invasiva mediante evasión de la activación del complemento mediada por CRP (fenotipo ChoP-) (Weiser et al.,

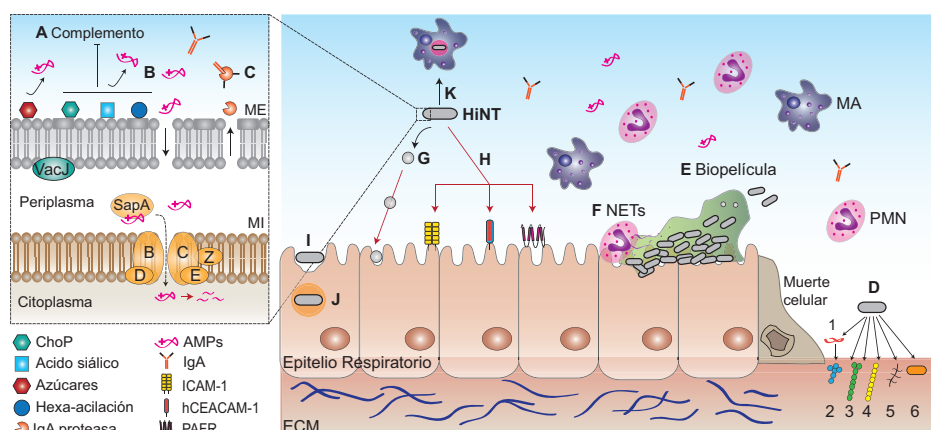


Figura 5. Mecanismos de persistencia y virulencia de HiNT. (A) Evasión del sistema de complemento por interacción con vitronectina, Factor H y C4BP a través de la decoración superficial de la molécula de LOS. (B) Resistencia a péptidos antimicrobianos, por cambios en carga y/o hidrofobicidad superficial bacteriana, determinada por la estructura de la molécula de LOS, y los sistemas VacJ/Mla y SapABCDFZ. (C) Secreción de IgA proteasa, que escinde la región bisagra de la IgA de la mucosa respiratoria. (D) Interacción con proteínas de ECM (1, plasminógeno; 2, laminina; 3, colágeno IV; 4, fibronectina; 5, proteoglicano; 6, vitronectina) expuestas por daño tisular pulmonar, a través de proteínas bacterianas de superficie. (E, F) La formación de biopelículas aumenta la resistencia bacteriana a la fagocitosis y a NETs. (G) Formación de OMVs, implicadas en competencia natural, invasión epitelio respiratorio, formación de biopelículas o resistencia a antibióticos. (H, I) La infección del epitelio respiratorio por HiNT está mediada por la interacción de ligandos bacterianos (algunos de ellos de naturaleza conocida) con receptores celulares (ICAM-1, hCEACAM y PAFR), a través de mecanismos de tipo zipper-like. Dicha interacción media la invasión epitelial por HiNT, localizado intracelularmente en compartimentos de tipo endosoma tardío en un estadio no replicativo (J). (K) Los macrófagos alveolares fagocitan HiNT utilizando la ruta PI3K-Akt, que es eliminado mediante procesamiento fagolisosomal. AMP, péptidos antimicrobianos; ECM, matriz extracelular; MA, Macrófago Alveolar; ME, Membrana Externa; MI, Membrana Interna; PMN, neutrófilo. Adaptada de (Ahearn et al., 2017).

1997; Weiser & Pan, 1998; Weiser et al., 1998).

(ii) **Resistencia a péptidos antimicrobianos**, mediada por: (a) modificación de carga e hidrofobicidad superficial de HiNT por la presencia de ácido siálico, ChoP y el grado de acilación del lípido A de la molécula de LOS; (b) la acción del sistema de transporte retrógrado de fosfolípidos VacJ/MlaA; y (c) el sistema SapABCDFZ, que interacciona con péptidos antimicrobianos en el periplasma a través de SapA, y facilita el transporte de los mismos a través de la membrana interna (SapBCDFZ) para su posterior degradación en el citoplasma (Fernandez-Calvet et al., 2018; Lysenko et al., 2000a; Mason et al., 2006; Nakamura et al., 2011; Shelton et al., 2011; Starner et al., 2002) (**Figura 5**). Además, SapABCDFZ es multifuncional, y está implicado en captación de hemina y potasio (Mason et al., 2006; Mason et al., 2011), adhesión epitelial (Raffel et al., 2013), arquitectura de biopelículas (Vogel et al., 2012) y virulencia (Mason et al., 2005).

(iii) **Interacción de HiNT con surfactante pulmonar**. Las heptosas y glucosas que forman parte de la molécula de LOS de HiNT son reconocidas por SP-A, SP-D y por la galectina humana 8 (Gal8), favoreciendo la opsonofagocitosis y bloqueando la infección bacteriana (Clark et al., 2016; Kalograiaki et al., 2016; LeVine et al., 2000; Ramadas et al., 2009; Stowell et al., 2014). La heterogeneidad del LOS intra- e intercepa minimiza el reconocimiento por estas lectinas, y favorece la evasión de la respuesta inmune innata (Hood et al., 1999a; Hood et al., 1999b; Hood et al., 2001; Masoud et al., 1997; Schweda et al., 2007).

(iv) **Adaptación metabólica y evasión de la inmunidad nutricional**, mediante: (a) utilización de glucosa como fuente de carbono mediante fermentación asistida por respiración, cuyos productos finales mayoritarios son ácido acético o ácido fórmico y succínico, en función de la mayor o menor disponibilidad de O₂, respectivamente (Othman et al., 2014); (b) ausencia de la ruta de β-oxidación de ácidos grasos por reducción genómica (Fernandez-Calvet et al., 2018; Fleischmann et al., 1995); (c) producción de ureasa, dependiente de la disponibilidad de nitrógeno (Murphy & Brauer, 2011); (d) respuesta frente

a estrés oxidativo, mediada por el regulón OxyR, al que pertenecen genes que codifican proteínas implicadas en defensa frente a estrés oxidativo (HktE, PgdX, Dps), Fe (HfeABCD) y reparación de ADN (Gnd, PntAB) (Harrison et al., 2007; Whitby et al., 2012); (e) producción de histidina, en función de localización anatómica (Juliao et al., 2007); (f) adquisición de Fe-hemina.

HiNT carece de los genes que codifican las enzimas que catalizan la conversión de ácido δ -aminolevulínico en protoporfirina IX (PPIX), precursor de hemina (Panek & O'Brian, 2002; White & Granick, 1963), por lo que requiere la presencia de PPIX en el medio, utilizada para sintetizar hemina a través de la actividad de la ferroquelatasa HemH (Loeb, 1995; Schlor et al., 2000) o, alternativamente, hemina (**Figura 6A**). Dada esta auxotrofia, HiNT presenta varios sistemas de captación de Fe-hemina: (a) sistemas dependientes de TonB-ExbDB, entre los que existen proteínas de membrana externa (Hup, HemR, Hgps, TbpBA) (Gray-Owen et al., 1995; Gray-Owen & Schryvers, 1995; Herrington & Sparling, 1985; Holland et al., 1992; Jarosik et al., 1995; Jin et al., 1996; Jin et al., 1999; Khan et al., 2007; LaCross et al., 2014; Morton & Stull, 1999; Morton et al., 2004; Ren et al., 1998; Seale et al., 2006), y proteínas secretadas o hemóforos (HxuCBA) (Cope et al., 1998; Cope et al., 2001; Fournier et al., 2011; Hanson et al., 1992a; Morton et al., 2007a; Wong et al., 1995); (b) sistemas independientes de TonB-ExbBD, entre los que se encuentran proteínas periplásmicas acopladas a transportadores ABC en la membrana interna (SapABCDFZ, HbpA-DppBCDF, HitABC) (Adhikari et al., 1995; Hanson et al., 1992b; Morton et al., 2009a; Morton et al., 2009b; Sanders et al., 1994; Vergauwen et al., 2010), y proteínas de membrana externa que almacenan y comparten hemina (proteína E, PE) (Al Jubair et al., 2014) (**Figura 6B**).

La caracterización del papel de los sistemas de captación de Fe-hemina en la interacción patógeno-hospedador durante la infección respiratoria por HiNT, ha sido objeto de estudio en el Capítulo 1 de este trabajo de Tesis Doctoral.

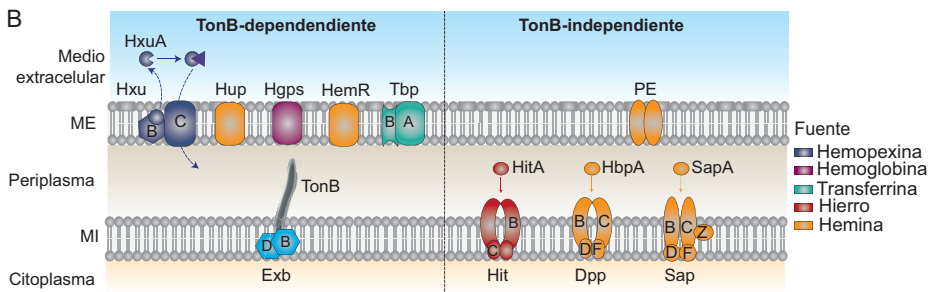
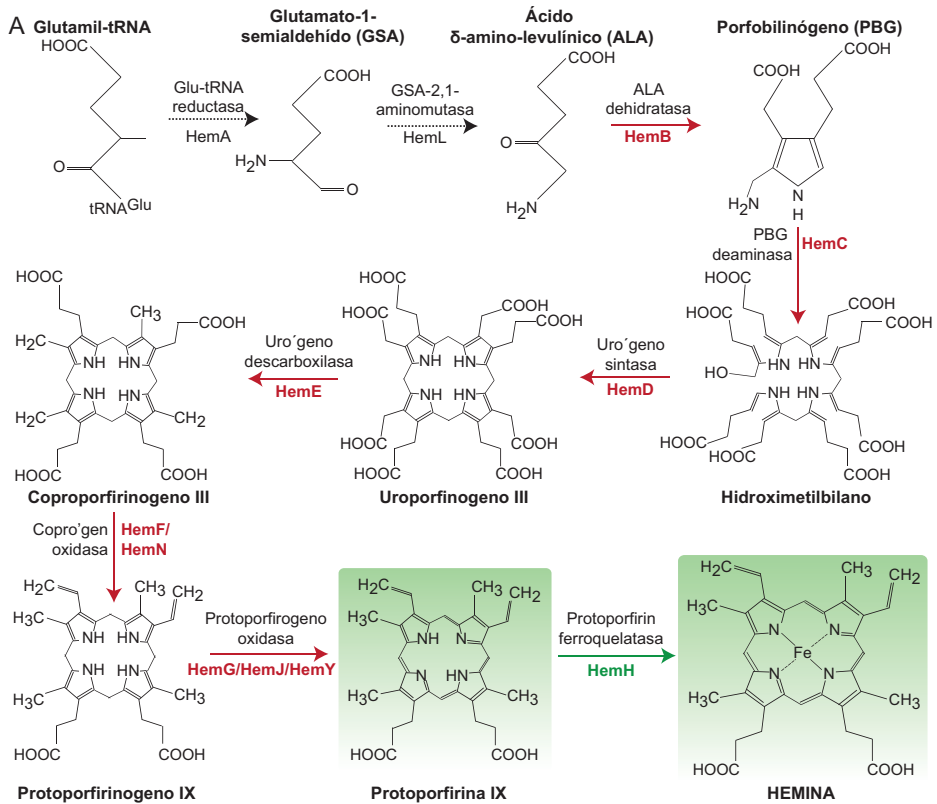


Figura 6. (A) Ruta de biosíntesis de hemina en bacterias Gram negativas. HiNT carece de las enzimas que convierten el ácido δ -aminolevulinico en protoporfirina IX (PPIX) (flecha roja). HiNT requiere la presencia en el medio extracelular de PPIX, que incorpora Fe a través de la ferroquelatasa (flecha verde); o alternativamente, hemina. Adaptada de (Choby & Skaar, 2016). **(B) Representación esquemática de los sistemas de captación de Fe-hemina de HiNT.** Izquierda, sistemas TonB-dependientes: HxuCBA, Hgps, TbpBA, HemR, Hup, implicados en captación de hemopexina, hemoglobina, transferrina y hemina. Derecha, sistemas TonB-independientes: HitABC, HbpA-DppBCDF, SapABCDFZ y PE.

(v) **Evasión de la inmunidad mediada por anticuerpos.** La inmunoglobulina A (IgA), particularmente la subclase IgA1 (~90% de IgA en el tracto respiratorio) (Brandtzaeg, 1992), desempeña un papel importante en la defensa del hospedador inhibiendo la adhesión microbiana y promoviendo la inmunidad humoral (Kilian et al., 1996). HiNT puede presentar hasta cuatro endopeptidasas extracelulares denominadas IgA proteasas (A1, A2, B1, B2), que escinden la región bisagra de IgA eliminando la actividad aglutinante (Murphy et al., 2017; Rao et al., 1999). Las IgA proteasas también contribuyen a la vida intracelular de HiNT (**ver apartado 3.3.5**) (Clementi et al., 2014; Murphy et al., 2017).

3.3.2. Interacción con proteínas de ECM

El daño tisular pulmonar asociado a la EPOC facilita la interacción de HiNT con proteínas de ECM, lo que permite la migración bacteriana hacia la membrana basal (St Geme, 2002). Existen evidencias de la interacción de proteínas de superficie de HiNT con plasminógeno (a través de PE), fibronectina (*Outer Membrane Protein* (OMP)-P4; Hap, PE), colágeno IV (Hap), laminina (proteína P4, también denominada lipoproteína E; Hap, PE) y vitronectina (proteína F, PE, OMP-P4) (Barthel et al., 2012; Euba et al., 2015c; Fink et al., 2002; Hallstrom et al., 2006; Hallstrom et al., 2011; Kenjale et al., 2009; Osman et al., 2018; St Geme, 2002; Su et al., 2016) (**Figura 5**).

3.3.3. Formación de biopelículas

La formación de biopelículas por HiNT es observada en condiciones experimentales y muestras clínicas de otitis media, y en las vías respiratorias inferiores de pacientes con fibrosis quística (Idicula et al., 2016; Jurcisek & Bakaletz, 2007; Post, 2001; Starner et al., 2006). Las biopelículas de HiNT presentan una matriz extracelular organizada con ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos β -glucanos, y células inflamatorias (trampas extracelulares de neutrófilos o *Neutrophil Extracellular Traps*, NETs) (Das et al., 2017; Domenech et al., 2016; Juneau et al., 2011; Swords, 2012). La formación de biopelículas favorece la resistencia de HiNT a la fagocitosis y las NETs, así

como a antimicrobianos solubles (péptidos y antibióticos), y facilita el desarrollo de infecciones persistentes (Ahearn et al., 2017; Hong et al., 2009; Juneau et al., 2011; Juneau et al., 2015) (**Figura 5**).

Los elementos de HiNT implicados en la formación de biopelículas, incluyen: (i) decoración de la molécula de LOS con ácido siálico y/o ChoP (Morey et al., 2011; Swords et al., 2004); (ii) ADN de doble hebra; (iii) proteínas de unión a ADN (proteína HU), factor de integración de huésped (*Integration Host Factor*, IHF), PilA, OMP-P2, OMP-P5 y OMP-P6 (Carruthers et al., 2012; Goodman et al., 2011; Hong et al., 2009; Juneau et al., 2011; Jurcisek & Bakaletz, 2007; Jurcisek et al., 2007; Wu, S. et al., 2014). Además, el estrés oxidativo y la depleción de Fe-hemina condicionan la arquitectura y formación de biopelículas de HiNT, a través de las proteínas Dps y SapF, respectivamente (Pang et al., 2012; Vogel et al., 2012).

3.3.4. Formación de vesículas de membrana externa

HiNT produce y libera vesículas de membrana externa (OMVs) de 20-200 nm de diámetro, esféricas, con envuelta de bicapa lipídica (Deich & Hoyer, 1982; Sharpe et al., 2011), que contienen: (i) ADN; (ii) restos de moléculas de LOS; (iii) proteínas periplásmicas y de membrana externa implicadas en adhesión celular (OMP-P5, OMP-P2, HMW1A, HMW1B, HMW2B), metabolismo (azúcares, lactato, poliaminas), proteasas (IgA proteasas, serin-proteasas, β -lactamasas), y captación de Fe-hemina (HbpA, HgpB, HitA); (iii) una fracción lipídica, formada por ácido palmítico y fosfatidiletanolamina (Roier et al., 2015; Sharpe et al., 2011). Están implicadas en competencia natural, formación de biopelículas, invasión epitelial, inmunomodulación, o resistencia antibiótica (Deich & Hoyer, 1982; Hong et al., 2009; Ren et al., 2012; Schaar et al., 2014; Sharpe et al., 2011) (**Figura 5**).

3.3.5. Infección del epitelio respiratorio

La infección epitelial por HiNT presenta varias etapas:

(i) **Adhesión.** HiNT interacciona con mucinas (a través de OMP-P2, OMP-P5 e HifA) (Reddy et al., 1996; Reddy et al., 1997), y con receptores epiteliales, entre los que se incluyen: ICAM-1, a través de los ligandos bacterianos Pila (proteína del *pilus* IV) y OMP-P5; hCEACAM-1, a través de OMP-P5 y FadL; y PAFR, a través de proteína D y moléculas de ChoP (Avadhanula et al., 2006; Euba et al., 2015c; Johnson et al., 2011; Moleres et al., 2018; Swords et al., 2000; Tchoupa et al., 2015). Además, en la infección epitelial por HiNT intervienen las adhesinas HMW1A, HMW2A, Hia, OapA y Hap, cuyos receptores celulares son desconocidos (Jurcisek et al., 2007; Laarmann et al., 2002; Mell et al., 2016; Novotny & Bakaletz, 2016; Prasadarao et al., 1999; St Geme et al., 1993; St Geme, 1994).

(ii) **Invasión celular,** observada en: epitelio conjuntivo (células Chang), nasal (células RPMI 2650), faríngeo (células Detroit-562), bronquial (células NCI-H292), alveolar (células A549, neumocitos tipo II), células subepiteliales y células del tejido adenoide (Ahren et al., 2001a; Ahren et al., 2001b; Euba et al., 2015c; Prasadarao et al., 1999; St Geme & Falkow, 1990). HiNT no posee mecanismos especializados de invasión activa (*triggered-like*), y su internalización es de tipo *zipper-like*, con la participación de elementos del citoesqueleto eucariota (actina o tubulina, según tipo celular) y de varias cascadas de señalización celular (Clementi & Murphy, 2011; Clementi et al., 2014; Ketterer et al., 1999; Lopez-Gomez et al., 2012; Morey et al., 2011; Swords et al., 2000). Asimismo, la formación de autoagregados bacterianos facilita la internalización epitelial por HiNT (Mell et al., 2016) (**Figura 5**).

(iii) **Vida intracelular.** HiNT reside intracelularmente en compartimentos de tipo endosoma tardío, en estadio no replicativo (Clementi & Murphy, 2011; Lopez-Gomez et al., 2012; Morey et al., 2011; van Schilfgaarde et al., 1999) (**Figura 5**). Además, la expresión de IgA proteasas facilita la persistencia intracelular por escisión de la región bisagra de IgA, implicada en la acidificación del compartimento lisosomal (Clementi et al., 2014; Murphy et al., 2017). Esta función ha sido descrita para las IgA proteasas A1 (Clementi et al., 2014), B1 y B2 (Murphy et al., 2017).

3.3.6. Interacción patógeno-fagocitos profesionales

La proteína D de HiNT media la adhesión a fagocitos y la fagocitosis por macrófagos (Ahren et al., 2001a; Craig et al., 2001). La internalización de HiNT está mediada por remodelación del citoesqueleto de actina, el colesterol de balsas lipídicas, y el eje de señalización PI3K-Akt. Tras su fagocitosis, HiNT es eliminado mediante procesamiento fagolisosomal (Marti-Llitas et al., 2009). La infección por HiNT inicia la formación de NETs, si bien el patógeno evade la muerte mediada por estas estructuras mediante la producción de compuestos antioxidantes (peroxiredoxina/glutaredoxina y catalasa), y la formación de biopelículas (Juneau et al., 2011; Juneau et al., 2015) (**Figura 5**).

3.4. Identificación de factores de virulencia de *H. influenzae*

La identificación de factores de virulencia de HiNT se ha llevado a cabo a través de distintas aproximaciones *in vivo* e *in vitro* (**Figura 7** y **Tabla A1**), que incluyen las siguientes estrategias:

(i) **Escrutinio de genotecas de mutantes generados por transposición.** En base a las características de los transposones utilizados, distinguimos *High-Throughput Insertion Tracking by deep Sequencing* (HITS) y *Transposon-sequencing* (Tn-seq). HITS utiliza transposones que carecen de sitios de restricción tipo IIS en sus repeticiones invertidas; Tn-seq incorpora en las secuencias invertidas del transposón *Mariner* la diana de la enzima de restricción *MmeI* (van Opijnen et al., 2009; van Opijnen & Camilli, 2013). Este tipo de genotecas se ha utilizado: (a) *in vitro* para identificar genes de HiNT esenciales para su crecimiento (Akerley & Lampe, 2002; Akerley et al., 2002), implicados en interacción con suero humano (Nakamura et al., 2011), evasión de la muerte mediada por neutrófilos (Langereis & Weiser, 2014), y formación de biopelículas (Marti et al., 2017); (b) *in vivo*, para la identificación de genes implicados en infección sistémica (Herbert et al., 2002), y pulmonar (Wong et al., 2013).

(ii) **Promoter Trap system** (TRAP) y escrutinio *in vivo* para identificación de promotores de HiNT activos durante la infección del oído medio en un modelo

de otitis media en chinchilla (Mason et al., 2003).

(iii) **Transformed Recombinant Enrichment Profiling (TREP)**. Mediante transformación natural de una cepa “receptora” con ADN genómico de una “cepa donadora”, TREP permite generar *pools* de clones recombinantes que incorporan fragmentos de ADN genómico de la cepa donadora. La utilización de cepas donadora y receptora con claras diferencias fenotípicas permite el diseño de escrutinios genómicos de ganancia de función, que seleccionan la adquisición de un rasgo fenotípico concreto por una cepa receptora como consecuencia de la captación del ADN donador portador de los determinantes genéticos de dicho fenotipo mediante transformación natural y doble recombinación homóloga. Este método ha sido utilizado para investigar la arquitectura genética de la invasión epitelial por HiNT *in vitro* (Mell et al., 2016).

(iv) **Proteoma *in vitro***, empleado para identificación de proteínas expresadas durante el crecimiento de HiNT en esputo humano (Qu et al., 2010).

(v) **Transcriptoma** de la infección epitelial por HiNT mediante “dual RNA-seq”, empleado para determinar el perfil de expresión de genes bacterianos y celulares durante el proceso infeccioso *in vitro* (Baddal et al., 2015).

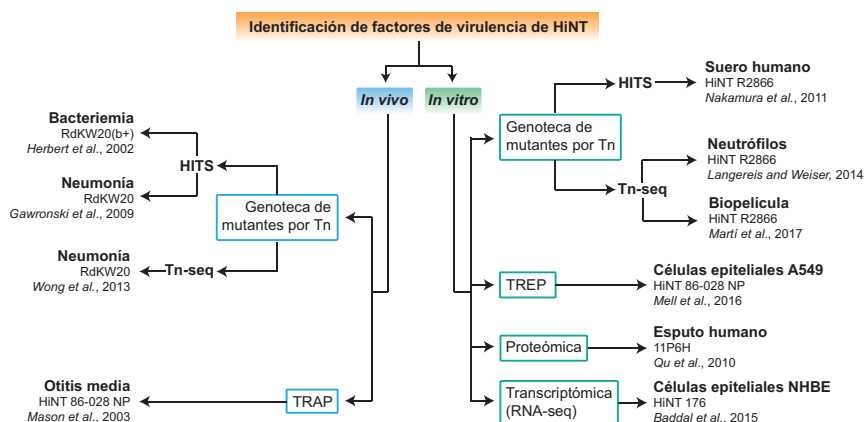


Figura 7. Escrutinios utilizados para la identificación de factores de virulencia de HiNT. *In vitro* (derecha): (i) genotecas de mutantes por transposición mediante *High-Throughput Insertion Tracking by deep Sequencing* (HITS) y *Transposon-sequencing* (Tn-seq); *Transformed Recombinant Enrichment Profiling* (TREP); proteómica; transcriptómica (dual RNA-seq). *In vivo* (izquierda): (i) genotecas de mutantes por transposición mediante HITS y Tn-seq; (ii) *Promoter Trap system* (TRAP).

La utilización de un modelo murino de pulmón enfisematoso inducido por instilación intratraqueal de EPP para realizar un escrutinio de factores de virulencia de HiNT mediante Tn-seq, ha sido objeto de estudio en el Capítulo 3 de este trabajo de Tesis Doctoral.

Hipótesis & Objetivos

La exposición crónica al humo de tabaco, principal factor de riesgo para desarrollar Enfermedad Pulmonar Crónica Obstructiva (EPOC), induce alteración de la homeostasis de hierro (Fe) pulmonar, comprometiendo la inmunidad nutricional del hospedador. El patógeno oportunista *Haemophilus influenzae* coloniza el pulmón EPOC, es auxótrofo a hemina, y ha evolucionado un panel de sistemas de captación de Fe-hemina; si bien, su contribución global a la patogénesis de este microorganismo es poco conocida. En este contexto, proponemos la siguiente **hipótesis**: “**La auxotrofia a hemina de *H. influenzae* ha evolucionado hacia una acción coordinada del repertorio de sistemas de captación de Fe de dicho patógeno, como mecanismo de evasión de la respuesta inmune**”.

La ausencia de vacunas efectivas frente a *H. influenzae* no tipificable, genera la necesidad de tratar y prevenir las infecciones en pacientes EPOC mediante administración de antibióticos, favoreciendo la aparición y transmisión de resistencias. El cotrimoxazol (TxS) interfiere en la síntesis de pirimidinas, inhibiendo la replicación de ADN. No existe información sobre la generación resistencia a TxS asociada a la auxotrofia a timidina ni de sus consecuencias en la patogénesis de *H. influenzae*. En base a estas observaciones, planteamos la siguiente **hipótesis**: “**La relación entre auxotrofia a timidina y resistencia a TxS puede modificar la dinámica de la interacción entre *H. influenzae* y el sistema respiratorio humano**”.

El desarrollo y caracterización de modelos animales preclínicos para el estudio de la biología de la EPOC y la valoración de nuevas terapias es clave en el contexto de la infección por *H. influenzae*, asociada a esta patología. Los escrutinios genéticos permiten identificar factores de virulencia, con potencial para ser nuevas dianas terapéuticas. Por ello, proponemos la siguiente **hipótesis**: “**El modelo de enfisema inducido por instilación de elastasa porcina pancreática mimetiza características de la EPOC y puede ser útil para identificar factores de virulencia de HiNT implicados en la colonización del pulmón enfisematoso**”.

Las hipótesis planteadas fueron abordadas mediante los siguientes **objetivos**:

1. Análisis del papel de los sistemas de captación de Fe-hemina en la patogénesis de *H. influenzae*.
2. Análisis del efecto de la auxotrofia a timidina en la resistencia antibiótica, fisiología y patogénesis de *H. influenzae*.
3. Análisis de un modelo murino de enfisema pulmonar e infección respiratoria por *H. influenzae*, y su aplicación al escrutinio de factores de virulencia bacterianos.

Capítulo 1

Los sistemas de adquisición de hemina de *Haemophilus influenzae* actúan de manera coordinada y multifuncional para evadir la inmunidad nutricional y contribuir a la infección respiratoria

1.1. Resumen

La retención y baja disponibilidad de Fe es una parte esencial de la inmunidad innata nutricional que los patógenos bacterianos contrarrestan con estrategias de captación de este micronutriente. El humo de tabaco contiene partículas que alteran la homeostasis de Fe a nivel pulmonar y sistémico, lo que puede aumentar la virulencia de patógenos oportunistas que colonizan los pulmones, como es el caso de HiNT. HiNT es auxótrofo a hemina, y el análisis de su genoma revela la presencia de múltiples sistemas de adquisición de Fe-hemina necesarios para la respiración aeróbica, si bien se desconoce su papel global en la infección respiratoria.

Este Capítulo aborda la función de los sistemas de captación de Fe-hemina en la infección pulmonar por HiNT. Para ello, se generaron mutantes simples en los sistemas *tbpBA*, *hxuCBA*, *sapABCDFZ*, *hbpA*, *hitABC* y *hpe*. Su caracterización mostró que HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA y PE son sistemas multifuncionales, involucrados en unión-almacenamiento de hemina, donación de hemina interbacteria y prevención de la toxicidad provocada por el exceso de hemina. Estas observaciones fueron apoyadas por la generación computacional de modelos tridimensionales plausibles con la interacción independiente de HbpA, SapA, PE y HxuA con hemina. Además, estos sistemas están implicados en la virulencia de HiNT, participando en la infección epitelial respiratoria, resistencia a péptidos antimicrobianos, importación de glutatión, e infección pulmonar murina. La multifuncionalidad observada resultó ser específica de cada sistema, limitando su redundancia funcional. Por otra parte, el análisis de expresión génica mostró la existencia de una interconexión entre estos sistemas que, además, responden a la disponibilidad de hemina en el medio extracelular.

En conjunto, el Capítulo 1 de este trabajo de Tesis Doctoral proporciona evidencias acerca del papel de HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA y PE como factores bacterianos que actúan de manera coordinada y multifuncional para subvertir la inmunidad nutricional y otros mecanismos de defensa innata del huésped durante la patogénesis de HiNT.

1.2. Introducción

La necesidad de las bacterias patógenas de captar metales de su entorno obliga a los hospedadores vertebrados a desarrollar mecanismos que limitan su biodisponibilidad. Esta limitación forma parte de la inmunidad innata y es denominada inmunidad nutricional, siendo el secuestro de Fe uno de sus aspectos principales. Los niveles de Fe están estrechamente controlados por sistemas reguladores del hospedador, que condicionan su absorción, transporte sistémico, distribución, captación celular y almacenamiento (Ali et al., 2017; Ghio, 2009). En contrapartida, los patógenos desarrollan mecanismos de captación de Fe del huésped durante la infección (Barber & Elde, 2015). De hecho, el exceso de Fe aumenta la virulencia de numerosos patógenos, lo que pone de manifiesto la protección proporcionada por la inmunidad nutricional (Skaar, 2010; Soares & Weiss, 2015).

El Fe existe en las formas ferrosa reducida (Fe^{2+}) o férrica oxidada (Fe^{3+}). El potencial redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ hace que este elemento sea extremadamente versátil cuando se incorpora a proteínas como centro catalítico o transportador de electrones, siendo esencial en numerosos procesos biológicos. Aunque abunda en la naturaleza, el Fe apenas se encuentra en su forma ferrosa biológicamente activa. En condiciones aeróbicas, Fe^{2+} es inestable y genera Fe^{3+} y ROS a través de la reacción de Fenton, que puede dañar lípidos, ADN y proteínas (Krewulak & Vogel, 2008). Por el contrario, Fe^{3+} es poco soluble en agua y requiere proteínas especializadas para facilitar su movilización y mantener los reservorios intracelulares. Las proteínas lactoferrina y transferrina transportan Fe, y la ferritina lo almacena (Choby & Skaar, 2016); sin embargo, la mayor parte de Fe en vertebrados se encuentra unido al anillo de porfirina como ferriprotoporfirina IX (grupo hemo) (Choby & Skaar, 2016). El grupo hemo está unido a proteínas, principalmente intracelulares (hemoglobina, mioglobina, citocromos). La hemoglobina de los eritrocitos lisados se une a la haptoglobina y la hemopexina séricas y, en menor medida, a la albúmina sérica, siendo así accesible para patógenos extracelulares (Cassat & Skaar, 2013). Numerosos patógenos usan el grupo hemo como fuente de Fe y dedican una maquinaria celular extensa a

su síntesis y/o adquisición (Cassat & Skaar, 2013; Choby & Skaar, 2016; Hood & Skaar, 2012). Sin embargo, el exceso de Fe-hemina es tóxico, y las bacterias desarrollan estrategias protectoras, basadas en la escisión del anillo de porfirina por acción catalítica de una hemooxigenasa o, alternativamente, en su eflujo, secuestro o almacenamiento (Anzaldi & Skaar, 2010; Choby & Skaar, 2016).

En el pulmón, el Fe es almacenado en ferritina; los macrófagos alveolares secuestran el grupo hemo de los eritrocitos senescentes, captan y almacenan el Fe de la transferrina, y eliminan el Fe de la materia particulada inhalada. Asimismo, los neutrófilos liberan moléculas reguladoras que ayudan a secuestrar Fe libre (Gammella et al., 2014; Ganz, 2012; Ghio et al., 2006). Los niveles de Fe en el pulmón humano oscilan entre 0.4-0.9 mg/gr, y los pulmones están expuestos a ~10 microgramos (μg) de Fe atmosférico/día durante una tasa de respiración normal. La exposición a concentraciones superiores de Fe mediante la inhalación de materia particulada proporciona Fe catalíticamente activo que genera daño tisular. La hemorragia alveolar observada en algunas patologías pulmonares conduce al catabolismo de la hemoglobina y al aumento de los niveles de Fe, y existen evidencias sobre la alteración de la homeostasis de Fe en enfermedades respiratorias importantes como es la EPOC (Ali et al., 2017; Ghio et al., 2008a; Ghio, 2009; Gozzelino & Arosio, 2016). El humo de tabaco, principal factor de riesgo de la EPOC (Wong et al., 2016), contiene partículas de Fe y sustancias tóxicas que inducen la acumulación de Fe intracelular y alteran su homeostasis pulmonar y sistémica (Ghio et al., 2008a; Ghio et al., 2008b). Dado que un exceso de Fe en el huésped favorece la incidencia de enfermedades infecciosas, la desregulación de la homeostasis de Fe en el pulmón EPOC puede potenciar la virulencia de patógenos oportunistas que colonizan las vías respiratorias bajas de estos pacientes (Cassat & Skaar, 2013; Ghio et al., 2006; Ghio, 2009).

HiNT persiste en el pulmón EPOC y contribuye a la inflamación crónica de las vías respiratorias, lo que empeora los síntomas y acelera la progresión de la enfermedad (Anzueto, 2010; Desai et al., 2014; Finney et al., 2014; Murphy et al., 2004). Las proteínas de unión a Fe, y el Fe propiamente dicho, pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de infecciones respiratorias

como las producidas por *H. influenzae*, por lo que la relación entre Fe e infección respiratoria puede repercutir en la patobiología y el tratamiento de la EPOC (Ali et al., 2017). HiNT es auxótrofo a hemina y posee un panel de sistemas implicados en la captación de Fe o hemina del medio extracelular (Adhikari et al., 1995; Al Jubair et al., 2014; Cope et al., 1998; Cope et al., 2001; Fournier et al., 2011; Gray-Owen et al., 1995; Gray-Owen & Schryvers, 1995; Hanson et al., 1992a; Hanson et al., 1992b; Herrington & Sparling, 1985; Holland et al., 1992; Jarosik & Hansen, 1995; Jin et al., 1996; Jin et al., 1999; Khan et al., 2007; LaCross et al., 2014; Morton & Stull, 1999; Morton et al., 2004; Morton et al., 2007a; Morton et al., 2009a; Morton et al., 2009b; Ren et al., 1998; Sanders et al., 1994; Seale et al., 2006; Vergauwen et al., 2010; Wong et al., 1995) (ver resumen en **Figura 6**). Sin embargo, la información disponible sobre la contribución de estos sistemas a la infección por HiNT ha sido generada de forma aislada (Morton et al., 2004; Morton et al., 2007b; Morton et al., 2009b; Seale et al., 2006; Szelestey et al., 2013), y carecemos de una visión global del papel relativo de estos sistemas durante la infección respiratoria por este patógeno.

En este trabajo, proponemos que la disrupción patológica de la homeostasis de Fe pulmonar y la auxotrofia a hemina pueden haber evolucionado hacia la acción coordinada del repertorio de sistemas de captación de Fe de HiNT, contribuyendo así a evadir la inmunidad nutricional y favorecer su patogénesis. La inactivación sistemática de genes bacterianos y su evaluación fenotípica determinaron la contribución relativa de TbpBA, HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA, HitABC y PE a la infección respiratoria por HiNT.

1.3. Materiales y Métodos

1.3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas, plásmidos y cebadores utilizados se describen en el **Anexo I (Tablas A2, A3 y A4)**. Las cepas de HiNT se crecieron durante 16 horas (h), a 37°C, con 5% CO₂, en agar chocolate (Biomérieux), Mueller Hinton-Fastidioso

agar (MH-F agar) (Biomérieux), *Haemophilus Test Medium* agar (HTM agar, Oxoid) o medio Infusión Cerebro-Corazón agar (*Brain-Heart Infusion medium*, BHI agar; Oxoid). El medio BHI se suplementó con 10 µg/ml NAD (factor V) (Sigma-Aldrich) (BHI-NAD). Alternativamente, HTM y BHI agar se suplementaron con 10 µg/ml NAD y 10 µg/ml hemina (factor X) (Merck) (sHTM y sBHI agar, respectivamente). Los cultivos líquidos se crecieron en BHI-NAD, sBHI, o medio mínimo químicamente definido (*Chemically Defined Minimal Medium*, CDMM) suplementado con cistina 50 micromolar (µM) (Sigma-Aldrich) o glutatión disulfuro (GSSG) 50 µM (Sigma-Aldrich) (**Tabla A5**) (Herriott et al., 1970; Vergauwen et al., 2003; Vergauwen et al., 2010). Para ello, se prepararon stocks de GSSG (20 miliMolar, mM) en agua estéril, y cistina 20 mM en HCl 1 M, se filtraron y mantuvieron a 4°C hasta su uso. Cuando fue necesario, se empleó eritromicina (Erm) 11 µg/ml (Erm₁₁) o espectinomomicina (Spec) 50 µg/ml (Spec₅₀). *Escherichia coli* se cultivó en Luria Bertani (LB) agar a 37°C, con ampicilina (Amp) 100 µg/ml (Amp₁₀₀), Erm₁₅₀ o Spec₅₀ µg/ml, cuando fue necesario.

1.3.2. Generación de cepas mutantes de *H. influenzae*

Se utilizaron dos estrategias para generar los mutantes de este Capítulo. Los plásmidos y cebadores empleados se muestran en el **Anexo I (Tablas A3 y A4)**. Un fragmento de ADN con la secuencia de cada gen/operón a mutar y sus respectivas regiones flanqueantes (para detalles específicos, véase **Anexo I**) se amplificó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) con *Phusion* polimerasa (Thermofisher), usando como molde ADN genómico de la cepa HiNT375, y cebadores específicos, gen_x+región flanqueante-F1 y gen_x+región flanqueante-R1. Cada producto de amplificación se clonó en pJET1.2 (Thermofisher) o pGEMT-easy (Promega), generando los plásmidos pJET1.2-*tbpBA*, pJET1.2-*hxuCBA*, pGEMT-*sapAB*, pJET1.2-*hbpA*, pJET1.2-*hpe* y pJET1.2-*fur*. Para generar pJET1.2-*hitABC*, dos fragmentos de ADN del operón *hitABC* fueron amplificados de forma independiente utilizando cebadores *hitABC*-F1/*hitABC*-R1 y *hitABC*-F2/*hitABC*-R2, respectivamente; ambos productos de PCR fueron digeridos con *KpnI*, y ligados, lo que generó

un producto de ligación conteniendo una delección de 853 pares de bases (pb) correspondientes al extremo 3' del gen *hitB* y 200 pb del extremo 5' del gen *hitC*. Este producto de ligación fue amplificado con los cebadores *hitABC*-F1 y *hitABC*-R2, y clonado en pJET1.2 para generar pJET1.2-*hitABC*.

Para generar las cepas $\Delta sapAB$ y $\Delta hitBC$, se generaron *cassettes* de interrupción con un gen de resistencia a Erm. Para ello, pGEMT-*sapAB* fue empleado como molde en una reacción de PCR inversa con *Phusion* polimerasa y los cebadores *sapAB*-F2 y *sapAB*-R2. El producto de amplificación generó una delección de 168 pb en el gen *sapA*, y se utilizó como vector como para el clonaje de un gen de resistencia a ErmC escindido por digestión con *SmaI* del plásmido pBSLerm (Allen et al., 2005), generando pGEMT-*sapAB*::ermC. Este plásmido se usó como molde para amplificar el *cassette* de interrupción *sapAB*::ermC con los cebadores *sapAB*-F1 y *sapAB*-R1. pJET1.2-*hitABC* se digirió con *KpnI* y se usó como vector para clonar un gen de resistencia a ErmC escindido por digestión *KpnI* de pBSLerm, generando pJET1.2-*hitABC*::ermC, que se utilizó como molde para amplificar el *cassette* de interrupción *hitABC*::ermC con los cebadores *hitABC*-F1 y *hitABC*-R2.

Para generar las cepas $\Delta tbpBA$, $\Delta hxuCBA$, $\Delta hbpA$, Δhpe y Δfur , se generaron *cassettes* de interrupción con un gen de resistencia a Spec. Para ello, el gen de resistencia Spec (Spec^r) se amplificó utilizando como molde el plásmido pRSM2832, y pares de cebadores mutagénicos específicos de cada gen: *tbpBA*-F2/*tbpBA*-R2; *hxuCBA*-F2/*hxuCBA*-R2; *hbpA*-F2/*hbpA*-R2; *hpe*-F2/*hpe*-R2; *fur*-F2/*fur*-R2 (Tracy et al., 2008). La cepa *E. coli* SW102 se creció en condiciones de inducción de recombinación y electroporación, y fue coelectroporada de forma independiente con pJET1.2-*tbpBA*, pJET1.2-*hxuCBA*, pJET1.2-*hbpA*, pJET1.2-*hpe* o pJET1.2-*fur* (50 nanogramos, ng), y con el *cassette* mutagénico Spec^r específico de cada gen (200 ng) (Sinha & Detsky, 2012). Se seleccionaron clones portadores de pJET1.2-*tbpBA*::spec, pJET1.2-*hxuCBA*::spec, pJET1.2-*hbpA*::spec, pJET1.2-*hpe*::spec y pJET1.2-*fur*::spec en LB agar con Amp₁₀₀ y Spec₅₀. Estos plásmidos se usaron como molde para amplificar los *cassettes* de interrupción *tbpBA*::spec, *hxuCBA*::spec, *hbpA*::spec,

hpe::spec y *fur::spec* con los pares de cebadores *tbpBA-F1/tbpBA-R1*; *hxCBA-F1/hxCBA-R1*; *hbpA-F1/hbpA-R1*; *hpe-F1/hpe-R1*; *fur-F1/fur-R1*, respectivamente. Los *cassettes* de disrupción se usaron independientemente para transformar HiNT375 o RdKW20 mediante transformación natural con el método MIV (Herriott et al., 1970).

Los clones transformantes se crecieron en sBHI agar con Erm₁₁, para seleccionar las cepas $\Delta sapAB$ y $\Delta hitBC$, y en sBHI agar con Spec₅₀ para seleccionar las cepas $\Delta tbpBA$, $\Delta hxCBA$, $\Delta hbpA$, Δhpe y Δfur . Todos los mutantes fueron confirmados mediante PCR.

1.3.3. Crecimiento bacteriano

Las cepas de HiNT se crecieron en agar chocolate durante 16 h para generar suspensiones bacterianas normalizadas en solución salina fosfatada (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) a Densidad Óptica 600 nanómetros (DO_{600})=1, que se inocularon en la superficie de placas con 20 ml BHI agar, en presencia de discos con los factores X+V estériles (Oxoid), y se incubaron durante 20 h a 37°C. El diámetro de crecimiento se midió en al menos tres ocasiones independientes ($n \geq 3$); los resultados se expresan en milímetros (mm) (media \pm desviación estándar, DE). Alternativamente, las suspensiones bacterianas normalizadas se diluyeron a $DO_{600}=0.05$ en 2 ml sBHI, y alícuotas de 200 microlitros (μ l) fueron transferidas a pocillos individuales de placa de 96 pocillos (Falcon). Las placas se incubaron con agitación a 37°C durante 6 h en un dispositivo Multiskan (Thermo Scientific). La DO_{636} se monitorizó cada 15 minutos (min). Cada curva de crecimiento se corrigió con los valores de medio sin inóculo bacteriano (sBHI).

Independientemente, las cepas se crecieron en agar chocolate durante 16 h para generar biomasa que fue inoculada en 7 ml BHI-NAD y crecida durante 8 h a 37°C con agitación (200 revoluciones por minuto, r.p.m.). Los cultivos se centrifugaron (10 min, 4.000 r.p.m.), y las suspensiones se normalizaron a $DO_{600}=1$ en PBS. Posteriormente, 180 μ l de CDMM, suplementado con cistina

50 μM o GSSG 50 μM , fueron transferidos a pocillos individuales de placas de 96 pocillos (Sarstedt). A continuación, se añadieron 20 μl /pocillo de las suspensiones bacterianas preparadas previamente. Las placas se incubaron en un lector de microplacas SpectraMAX 340 a 37°C y se registró DO_{600} cada 30 min durante 8 h. El crecimiento bacteriano se monitorizó por triplicado, en al menos tres ocasiones independientes ($n \geq 9$).

1.3.4. Determinación semicuantitativa de la unión de hemina a la superficie bacteriana

Las cepas de HiNT se crecieron en agar chocolate durante 16 h para su posterior inoculación y cultivo en 5 ml BHI-NAD durante 8 h, a 37°C con agitación (200 r.p.m.). A continuación, se inocularon 100 μl de cada cultivo en 20 ml sBHI y se crecieron durante 16 h en las mismas condiciones. Tras este tiempo, se recogieron suspensiones bacterianas normalizadas mediante centrifugación (10 min, 4.000 r.p.m.), se lavaron tres veces con PBS, y se resuspendieron en 5 ml de PBS. Las suspensiones bacterianas se diluyeron (1:2) en PBS, y 100 μl /dilución fueron transferidos a membranas de PVDF. La hemina se detectó utilizando el kit de detección de quimioluminiscencia de Western Blot (ECL) (Pierce), según (Al Jubair et al., 2014).

1.3.5. Cocultivo de HiNT3655*luxABCDE* con cepas de *H. influenzae* donadoras de hemina

Para analizar la transferencia de hemina entre cepas de HiNT, se cocultivó HiNT3655*luxABCDE* (empleada como cepa receptora de hemina) con cepas problema (donadoras de hemina). Las cepas donadoras se crecieron en agar chocolate durante 16 h para su posterior inoculación en 5 ml BHI-NAD, y se crecieron durante 8 h con agitación (200 r.p.m.). A continuación, se transfirieron 100 μl de estos cultivos a 20 ml sBHI, y se crecieron durante 16 h en las mismas condiciones. Para deplecionar la hemina, HiNT3655*luxABCDE* fue crecida en agar chocolate, posteriormente inoculada en 20 ml BHI-NAD, y crecida durante 16 h en agitación (200 r.p.m.). Los cultivos se recuperaron mediante

centrifugación (10 min, 4.000 r.p.m.), se lavaron dos veces con BHI, y se resuspendieron en 10 ml BHI. Para los cocultivos, volúmenes apropiados de cada suspensión bacteriana, donadora y receptora, con el mismo número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.), fueron mezclados en 5 ml BHI-NAD, con DO_{600} inicial=0.1, y crecidos a 37°C, 5% CO₂ y 200 r.p.m. durante 6 h. Como controles, se emplearon cultivos de HiNT3655*luxABCDE* similares, crecidos en sBHI o BHI-NAD (positivo y negativo, respectivamente). Se realizó cuantificación de luminiscencia cada hora durante 6 h en un contador 1450 MicroBeta TriLux (Perkin-Elmer), utilizando 100 µl de los cocultivos bacterianos/medida en placas negras de 96 pocillos (Uniplate®, Whatman). Los experimentos se realizaron por triplicado, en al menos en 3 ocasiones independientes (n>9).

1.3.6. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada mediante microdilución en paneles comerciales (STRHAE2; Sensititre), siguiendo los criterios del *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)* (Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 27th Edition. CLSI M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2017).

La susceptibilidad bacteriana frente al péptido catiónico polimixina E (PxE) se determinó mediante *E-test* (Biomérieux) en MH-F agar. Para ello, las cepas de interés fueron crecidas en agar chocolate durante 8 h, para su posterior inoculación en 7 ml de (i) BHI-NAD o (ii) sBHI, y crecimiento durante 12 h, a 37°C y 200 r.p.m. Los cultivos se centrifugaron (10 min, 4.000 r.p.m.) y las suspensiones se normalizaron a DO_{600} =0.5 McFarland (equivalente a DO_{600} =0.063) en solución salina para su uso como inóculo en MH-F agar.

Para determinar la susceptibilidad bacteriana a peróxido de hidrógeno (H₂O₂), las cepas de interés se crecieron en agar chocolate durante 8 h, para su posterior inoculación en 7 ml de (i) BHI-NAD o (ii) sBHI, y crecimiento durante 12 h a 37°C, 200 r.p.m. Los cultivos se centrifugaron (10 min, 4.000 r.p.m.) y

las suspensiones bacterianas se normalizaron a $DO_{600}=1$ ($\sim 7 \times 10^8$ u.f.c./ml), y plaquearon en sHTM agar en placas Petri de 20 cm de diámetro con 80 ml sHTM agar/placa, empleando 1.8 ml suspensión bacteriana/placa. Se usó H_2O_2 9.8 M (Sigma-Aldrich) como solución madre para realizar las diluciones necesarias en H_2O estéril. Se empaparon discos de papel estériles de 10 mm diámetro con 10 μ l, conteniendo 6.25, 12.5, 25 ó 50 micromoles (μ mol) de H_2O_2 . Los discos fueron colocados sobre el medio sHTM agar previamente inoculado con las cepas de interés, y las placas se incubaron durante 20 h a 37°C. Los resultados se muestran como diámetro de la inhibición del crecimiento bacteriano (mm) alrededor de los discos de H_2O_2 (media \pm DE). Los ensayos se realizaron en al menos, tres ocasiones independientes ($n > 3$).

1.3.7. Extracción de ARN y análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Las cepas de HiNT se crecieron durante 16 h en agar chocolate. A continuación, se inocularon 2-5 colonias/cepa en 20 ml sBHI, se crecieron durante 11 h, se diluyeron en 40 ml sBHI fresco a $DO_{600}=0.05$, y se crecieron hasta $DO_{600}=0.5-0.6$. Alternativamente, se empleó la biomasa bacteriana crecida en agar chocolate para ser inoculada en 5 ml BHI-NAD y crecida durante 8 h. A continuación, se inocularon alícuotas de 100 μ l en 20 ml sBHI y se crecieron durante 16 h en las mismas condiciones (37°C, 5% CO_2 , 200 r.p.m.). Estos cultivos fueron recogidos mediante centrifugación (10 min, 4.000 r.p.m.), se lavaron 3 veces con PBS, se resuspendieron en 5 ml PBS, se diluyeron a $DO_{600}=0.05$ en 40 ml de (i) BHI-NAD, o (ii) sBHI, y se crecieron hasta $DO_{600}=0.5-0.6$.

El ARN bacteriano total se extrajo mediante el método TRIzol (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. La calidad del ARN total se evaluó usando ARN 6000 Nano LabChips (Agilent 2100 Bioanalyzer, Santa Clara, CA). Todas las muestras presentaron bandas de ARN ribosómico 23S y 16S intactas. La transcripción inversa (RT) se realizó utilizando 1 μ g de ARN con los reactivos SuperScript II RT (Invitrogen) o el kit de reactivo RT de PrimerScript (Takara). La amplificación se realizó utilizando Thermo Scientific Luminaris

HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Scientific) o SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara). Los datos de fluorescencia se analizaron con BioRad CFX96 qPCR System (Bio-Rad) o AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). El método del ciclo umbral comparativo (Ct) se usó para obtener cantidades relativas de ARNm que se normalizaron utilizando ARN ribosómico 16S como control endógeno. Los pares de cebadores se diseñaron con el *software Primer3* (**Anexo I, Tabla A4**). Todas las medidas se realizaron en triplicado, al menos 2 ocasiones ($n \geq 6$).

1.3.8. Cultivo de células epiteliales e infección bacteriana

Se emplearon neumocitos tipo II humanos A549 (ATCC CCL-185) según (Morey et al., 2011). Se depositaron 6×10^4 células/pocillo durante 32 h y se mantuvieron en hambre de suero durante las 16 h previas a la infección. Las infecciones se realizaron y procesaron según (Euba et al., 2015b; Euba et al., 2015c; Lopez-Gomez et al., 2012; Morey et al., 2011; Morey et al., 2013; Rodriguez-Arce et al., 2017).

Se prepararon suspensiones bacterianas normalizadas en PBS ($DO_{600} = 1$) usando cepas de HiNT crecidas en agar chocolate durante 16 h. Alternativamente, se prepararon cultivos bacterianos, tal y como se indica en la **sección 1.3.6**, y se normalizaron a $DO_{600} = 1$ en PBS. En todos los casos, se utilizó una multiplicidad de infección (*Multiplicity of infection*, MOI) $\sim 100:1$. Para cuantificar la adhesión bacteriana, las células se infectaron durante 30 min. Para monitorizar la invasión, las células se infectaron durante 2 h, se lavaron 3 veces con PBS, y se incubaron durante 1 h en medio RPMI 1640 con FCS 10%, Hepes 10 mM y gentamicina 200 $\mu\text{g/ml}$. Todas las infecciones se realizaron por triplicado, en al menos tres ocasiones independientes ($n \geq 9$). Los resultados se expresan como u.f.c./pocillo.

1.3.9. Secreción de IL-8

Para la estimulación de células A549 por HiNT, las bacterias crecidas en agar chocolate fueron recogidas con PBS, y se generaron suspensiones normalizadas a $DO_{600} = 1$, usadas para infección celular durante 2 h con MOI $\sim 100:1$. Las células

se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 6 h en medio RPMI 1640 con FCS 10%, Hepes 10 mM y gentamicina 100 µg/ml. Los sobrenadantes se recogieron de los pocillos, los restos celulares se eliminaron por centrifugación, y las muestras se congelaron a -80°C. Los niveles de IL-8 en los sobrenadantes se cuantificaron mediante ELISA (Abnova KA0115), con sensibilidad <2 picogramos (pg)/ml. Las infecciones se realizaron por duplicado, al menos dos ocasiones (n≥4). Los resultados se expresan como IL-8 pg/ml.

1.3.10. Infección pulmonar murina por HiNT

La infección pulmonar se realizó según (Euba et al., 2015b; Euba et al., 2015c; Morey et al., 2013; Rodríguez-Arce et al., 2017). Se emplearon ratones hembra CD1 (18-20 g) de 4 a 5 semanas de edad (Charles River), alojados en condiciones libres de patógenos en las instalaciones del Instituto de Agrobiotecnología (número de registro 365 ES/31-2016-000002-CR-SU-US), y se usaron al alcanzar 22-25 gr (6-7 semanas). La manipulación de los animales y los procedimientos empleados se ajustaron a la legislación europea (Directiva 86/609/CEE) y nacional (Real Decreto 367 53/2013) vigente, siguiendo las directrices FELASA y ARRIVE, y con la aprobación del Comité de experimentación animal de la Universidad Pública de Navarra (UPNa), y la autorización del Gobierno Autónomo.

Para la inoculación intranasal de HiNT, las cepas de interés crecidas en agar chocolate fueron resuspendidas en PBS generando suspensiones normalizadas ($\sim 5 \times 10^9$ u.f.c./ml). A continuación, se colocaron 20 µl ($\sim 1 \times 10^8$ u.f.c./ratón) en la entrada de las fosas nasales hasta su inhalación completa. Los ratones fueron anestesiados previamente con ketamina-xilazina (3:1). Tras 24 ó 48 h post-infección (hpi), los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se obtuvieron muestras de LBA por perfusión y recolección de 0.7 ml PBS, con la ayuda de un catéter intravenoso Vialon™ estéril de 20G (1.1 mm de diámetro) (Becton-Dickinson) insertado en la tráquea. El LBA recuperado se diluyó (1:10) en PBS, y se sembró por triplicado en sBHI agar para determinar el número de bacterias viables. Siguiendo procedimientos estandarizados (Grillo et al.,

2012), consideramos la posibilidad de tener un mínimo de 3.3 u.f.c. en 1 ml de muestra sin ser detectados (límite de detección $<3-4$ u.f.c./ml), equivalente a $\log_{10}=0.52$. Los resultados se expresan como media \pm DE de \log_{10} u.f.c./ml LBA. El pulmón izquierdo se pesó individualmente en bolsas estériles (Stomacher80, Seward Medical) y se homogeneizó 1:10 (peso/volumen, p/vol) en PBS. Cada homogeneizado se diluyó en PBS (1:10) y se sembró por triplicado en sBHI agar para determinar el número de bacterias viables. Los resultados se muestran como media \pm DE de \log_{10} u.f.c./pulmón.

1.3.11. Modelado computacional

La unión de hemina a HbpA, SapA, PE y HxuA fue analizada computacionalmente utilizando HADDOCK 2.2 (alta ambigüedad de proteína-proteína DOCKing) (Meyer et al., 2016; van Zundert et al., 2016). Para HbpA y SapA, se utilizó I-TASSER (Roy et al., 2010; Zhang, 2008) para generar modelos de homología basados en la estructura cristalina de HbpA de *Haemophilus parasuis* en su forma ligada (código APB 3M8U) (Vergauwen et al., 2010). Para ambas proteínas, se usó el modelo I-TASSER con mayor puntuación. Para analizar la unión de hemina (ligando), se incluyeron residuos con 60% de probabilidad de unión del ligando, estimados por la función COACH dentro del conjunto I-TASSER (Yang et al., 2013a; Yang et al., 2013b) como parte de una estimación inicial de la ubicación del sitio de unión (para HbpA, residuos 61-64, 155, 280, 396, 398, 445-447 y 537; para SapA, residuos 54-55, 458-460 y 462). En el caso de SapA, la unión de hemina también fue analizada tras eliminar los residuos 140-158. En el caso de PE, la hemina se acopló a la estructura cristalina del dímero de PE (3ZH5). Los residuos de ambos monómeros dentro del bolsillo de unión de hemina predicho (59, 65, 67, 94, 96, 98, 101, 103 y 107) se usaron para impulsar el acoplamiento. En el caso de HxuA, la hemina se ancló a la estructura cristalina de HxuA (código PDB 4RM6) y se usaron residuos en un bolsillo de unión putativo identificado manualmente (450, 452, 464, 516, 526, 556, 560 y 572) para analizar la unión. Las soluciones de acoplamiento se evaluaron según la probabilidad HADDOCK y Z (el número de desviaciones estándar de puntuación HADDOCK del clúster dado se separa de la media de

todos los conglomerados). En el caso de HbpA, SapA (variante truncada) y PE, se obtuvo un solo grupo por proteína de solución estadísticamente significativa ($p < 0.05$); mientras que en el caso de HxuA, se obtuvieron dos soluciones plausibles. Para SapA en su variante completa, se obtuvo una segunda solución (grupo 4) con una puntuación HADDOCK comparable a la solución superior, si bien se descartó debido a la puntuación Z significativamente mayor (-0.2 en comparación con -1.7 para la solución superior). El modelo de cada grupo se analizó en PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, versión 2.0, Schrödinger, LLC) y LigPlot+ (Laskowski & Swindells, 2011).

1.3.12. Análisis estadístico

En todos los casos, el valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron con el programa Prism versión 7, paquete estadístico para Mac (GraphPad Software), y se detallan en cada pie de figura.

1.4. Resultados

1.4.1. Contribución diferencial de los sistemas de adquisición de Fe-hemina a la infección respiratoria por HiNT

Los sistemas de unión-captación de Fe de HiNT considerados en este trabajo se muestran en la **Figura 8**. HiNT375 se empleó como cepa de referencia para generar mutantes en los sistemas *tbpBA*, *hxuCBA*, *sapABCDFZ*, *hbpA*, *hitABC*

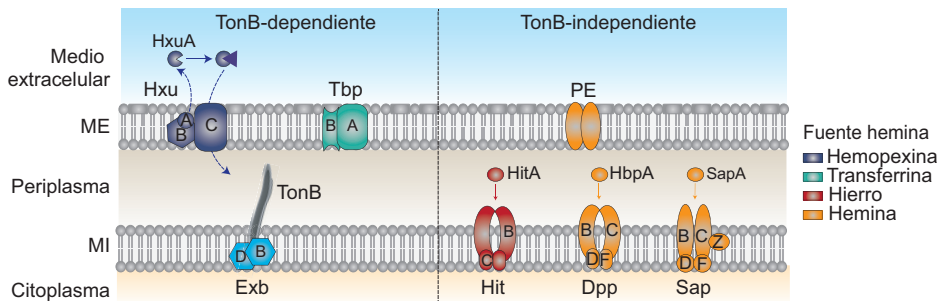


Figura 8. Representación esquemática de los sistemas de captación de Fe-hemina analizados en este trabajo. Sistemas TonB-dependientes, izquierda: HxuBCA, TbpBA; sistemas TonB-independientes, derecha: HitABC, HbpA-DppBCDF, SapABCDFZ y PE. Las fuentes de Fe-hemina aparecen codificadas por colores.

y *hpe* (números de acceso NF38_09005/NF38_09000, NF38_04090/NF38_04085/NF38_04080, NF38_08010/NF38_0801/NF38_08020/NF38_08025/NF38_08030/NF38_08035, NF38_00680, NF38_04985/NF38_04980/NF38_04975, y NF38_04540, respectivamente) (para más detalle, ver **Anexo I, Tablas A2 y A3**). El crecimiento de los mutantes generados en sBHI fue comparable al de la cepa silvestre (*wild-type*, WT), con una fase de latencia ligeramente mayor en los mutantes $\Delta hxcuCBA$, $\Delta hbpA$ y Δhpe (**Figura 9A**). El crecimiento aerobio en BHI agar alrededor de discos de papel con los factores X+V fue comparable entre cepas, excepto en el caso $\Delta hxcuCBA$ y $\Delta hitBC$ que mostró una tendencia a ser menor que el de la cepa WT (HiNT375 WT, 138 ± 17 mm; HiNT375 $\Delta hxcuCBA$, 122 ± 18 mm; HiNT375 $\Delta hitBC$, 112 ± 12 mm) (**Figura 9B**). El crecimiento anaerobio en BHI agar alrededor de discos de factor V fue comparable entre cepas, y el análisis de un panel de 18 antimicrobianos mostró patrones de susceptibilidad comparables entre cepas (datos no mostrados).

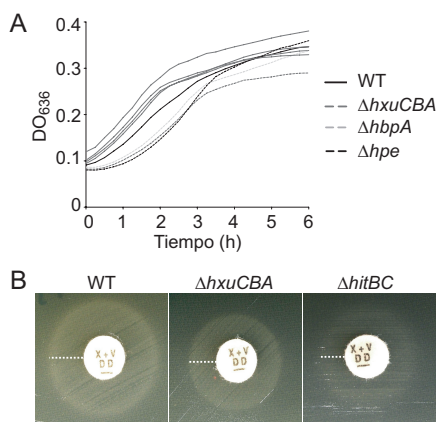


Figura 9. Efecto de la inactivación de los sistemas de captación de Fe-hemina en el crecimiento de *H. influenzae*. (A) Crecimiento de las cepas HiNT375 WT, $\Delta tbpBA$, $\Delta hxcuCBA$, $\Delta sapAB$, $\Delta hbpA$, $\Delta hitBC$ y Δhpe en sBHI, mostrado como media \pm DE de DO₆₃₆ a los tiempos indicados. (B) Imagen representativa del crecimiento de las cepas HiNT375 WT, $\Delta hxcuCBA$ y $\Delta hitBC$ en BHI agar alrededor de discos con los factores X+V.

Dado que la maquinaria de adquisición de Fe-hemina puede estar relacionada con la patogénesis bacteriana (Ali et al., 2017; Cassat & Skaar, 2013), analizamos la contribución de estos sistemas seleccionados en la infección respiratoria por HiNT. Para ello, analizamos el efecto de la inactivación de *tbpBA*, *hxcuCBA*, *sapABCDFZ*, *hbpA*, *hitABC* o *hpe* en la interacción de HiNT con neumocitos tipo II humanos, células A549. La invasión epitelial de HiNT375 $\Delta hxcuCBA$,

HiNT375 Δ *sapAB*, HiNT375 Δ *hbpA*, HiNT375 Δ *hitBC* y HiNT375 Δ *hpe* fue inferior a la de la cepa WT (**Figura 10A, panel izquierdo**). Todas las cepas estimularon secreción de IL-8 epitelial, si bien la respuesta fue menor tras la infección por HiNT375 Δ *tbpBA*, HiNT375 Δ *hxuCBA*, HiNT375 Δ *sapAB* y HiNT375 Δ *hpe* que por la cepa WT (**Figura 10A, panel derecho**). A continuación, analizamos el efecto de la inactivación de estos sistemas *in vivo*, mediante el uso de un modelo de infección respiratoria murina (Euba et al., 2015b; Euba et al., 2015c; Euba et al., 2017; Morey et al., 2013; Rodríguez-Arce et al., 2017). Tras infección intranasal, cuantificamos la carga bacteriana en pulmón y muestras LBA, a 24 y 48 hpi. A 24 hpi, la carga pulmonar de HiNT375 Δ *hxuCBA*, HiNT375 Δ *hbpA* y HiNT375 Δ *hpe* fue inferior a la de la cepa WT; igualmente, los recuentos de HiNT375 Δ *hxuCBA* en LBA fueron menores a los de la cepa WT (**Figura 10B, paneles izquierdos**). A 48 hpi, todos los mutantes excepto HiNT375 Δ *tbpBA* presentaron recuentos inferiores en muestras de pulmón y LBA a los de la cepa WT (**Figura 10B, paneles derechos**).

En conjunto, los sistemas de adquisición de Fe/hemina analizados participan de forma diferencial en la infección respiratoria por HiNT, siendo la contribución de HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA, HitABC y PE mayor que la de TbpBA. En base a estas observaciones, TbpBA no fue considerado en los análisis posteriores de este trabajo.

1.4.2. Los sistemas de adquisición de Fe-hemina de HiNT están relacionados a nivel transcripcional

Evidencias previas sugieren que *H. influenzae* transcribe los genes que codifican sistemas de adquisición de Fe-hemina durante procesos de infección aguda (Whitby et al., 1997), y que dicha expresión está regulada por Fur, en base a la disponibilidad de Fe en el medio (Harrison et al., 2013; Whitby et al., 2006; Whitby et al., 2009). De forma análoga a lo descrito para la cepa HiNT 86-028 NP, la expresión de *tbpA*, *hxuA* y *hitB* fue mayor, y la expresión de *hbpA* menor en HiNT375 Δ *fur* que la cepa WT (**Tabla 2**), confirmando que estos genes forman parte del regulón de Fur (Harrison et al., 2013). Asimismo,

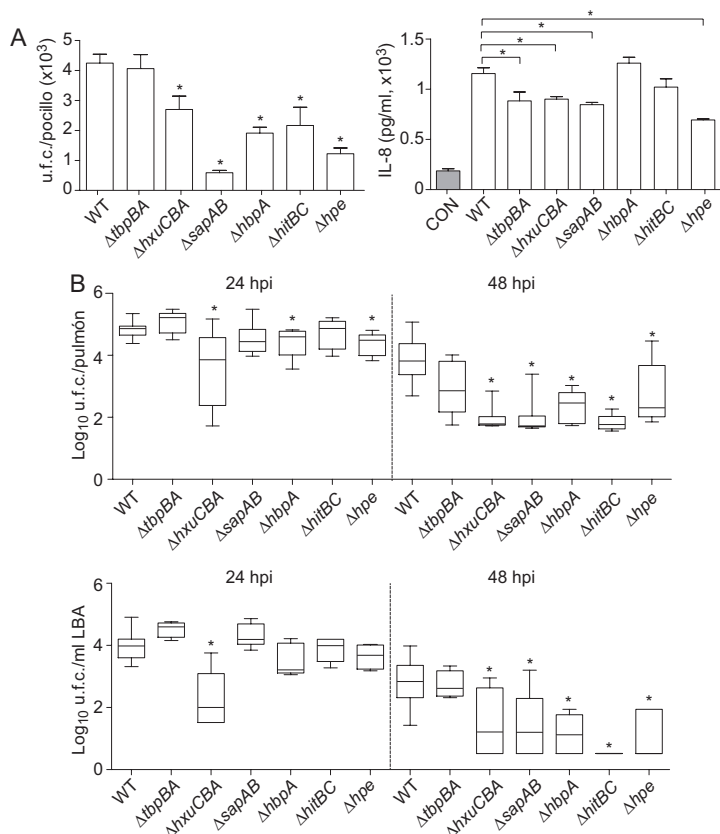


Figura 10. Evaluación sistemática de la contribución de seis sistemas de adquisición de Fe-hemina de HiNT a la interacción patógeno-hospedor en las vías respiratorias. (A) Efecto de la inactivación de los sistemas de adquisición de Fe-hemina en la interacción de HiNT con células del epitelio respiratorio. Se emplearon neumocitos tipo II (línea celular A549) para cuantificar la invasión de HiNT375 WT y las cepas mutantes $\Delta tbpBA$, $\Delta hxuCBA$, $\Delta sapAB$, $\Delta hbpA$, $\Delta hitBC$ y Δhpe (panel izquierdo). La inactivación de los sistemas $hxuCBA$, $sapABCDZFZ$, $hbpA$, $hitABC$ y hpe redujo significativamente la tasa de invasión ($\Delta hxuCBA$, $p < 0.05$; $\Delta sapAB$ y Δhpe , $p < 0.0001$; $\Delta hbpA$, $p < 0.005$; $\Delta hitBC$, $p < 0.01$). Los datos se muestran como media \pm DE u.f.c./pocillo. Comparación estadística, t -test de dos colas. Panel derecho: la secreción de IL-8 por células infectadas por HiNT375 $\Delta tbpBA$, HiNT375 $\Delta hxuCBA$, HiNT375 $\Delta sapAB$ y HiNT375 Δhpe fue menor que la observada en células infectadas por la cepa WT ($\Delta tbpBA$, $p < 0.05$; $\Delta hxuCBA$, $p < 0.01$; $\Delta sapAB$, $p < 0.005$; Δhpe , $p < 0.0005$). Se muestran medias \pm DE pg/ml. Comparación estadística, t -test de dos colas. **(B)** Efecto de la inactivación de los sistemas de captación de Fe-hemina en la infección pulmonar. Ratones CD1 fueron infectados por vía intranasal con $\sim 2 \times 10^8$ u.f.c./ratón y se sacrificaron a 24 y 48 hpi. Se cuantificó la carga bacteriana en pulmón (panel superior, \log_{10} u.f.c./pulmón) y LBA (panel inferior, \log_{10} u.f.c./ml LBA). En pulmón, HiNT375 $\Delta hxuCBA$, HiNT375 $\Delta hbpA$, HiNT375 Δhpe mostraron recuentos significativamente menores a los de la cepa WT a 24 hpi ($\Delta hxuCBA$ y Δhpe , $p < 0.01$; $\Delta hbpA$, $p < 0.05$). Todos los mutantes, excepto HiNT375 $\Delta tbpBA$, mostraron cargas significativamente menores que la cepa WT a 48 hpi ($\Delta hxuCBA$, $\Delta sapAB$ y $\Delta hbpA$, $p < 0.0001$; $\Delta hitBC$, $p < 0.001$; Δhpe , $p < 0.05$). En LBA, HiNT375 $\Delta hxuCBA$ mostró menor carga que la cepa WT a 24 hpi ($p < 0.0001$). A 48 hpi, todos los mutantes excepto $\Delta tbpBA$ mostraron cargas significativamente menores ($\Delta hxuCBA$, $p < 0.01$; $\Delta sapAB$, $\Delta hbpA$ y Δhpe , $p < 0.005$; $\Delta hitBC$, $p < 0.0001$) que la cepa WT. Los datos se muestran como media \pm DE. Comparación estadística, t -test de dos colas.

la separación electroforética y tinción con azul de Coomassie de extractos proteicos de cultivos de HiNT375 WT y Δfur presenta patrones comparables, con una banda consistentemente sobreexpresada en HiNT375 Δfur identificada como HitA mediante MALDI-TOF/TOF (datos no mostrados).

Tabla 2. Regulación por Fur: expresión de genes que codifican proteínas integrantes de sistemas de captación de Fe-hemina en *H. influenzae*.

Gen	Fold change, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (A/B) ^a
<i>tbpA</i>	8.65*
<i>hxuA</i>	6.66*
<i>sapA</i>	1.47*
<i>hbpA</i>	0.76*
<i>hitB</i>	7.20*
<i>hpe</i>	2.47*

^aA, HiNT375 Δfur ; B, HiNT375 WT

* $p < 0.05$, comparación estadística de media de los valores (Δfur vs WT) por *t-test* de dos colas.

La presencia de múltiples sistemas de adquisición de Fe-hemina en el genoma de HiNT posiblemente compensa la auxotrofia a hemina, si bien puede ser un caso de redundancia funcional. Dichos sistemas pueden estar a su vez coordinados como estrategia de prevención de la toxicidad asociada a un exceso de hemina. A continuación, exploramos una posible coordinación a nivel transcripcional, mediante análisis de la expresión relativa de los genes *hxuA*, *sapA*, *hbpA*, *hitB* y *hpe* en HiNT WT y cepas mutantes. Observamos que: (i) la expresión de *hxuA* fue significativamente mayor en los mutantes $\Delta hbpA$, $\Delta hitBC$ y Δhpe que en la cepa WT; (ii) la expresión de *sapA* fue mayor en los mutantes $\Delta hxuCBA$, $\Delta hbpA$, $\Delta hitBC$ y Δhpe que en la cepa WT; (iii) la expresión de *hbpA* fue menor en los mutantes $\Delta hxuCBA$ y $\Delta sapAB$ que en la cepa WT; (iv) la expresión de *hitB* fue mayor en los mutantes $\Delta hbpA$ y Δhpe que en la cepa WT; (v) la expresión de *hpe* fue mayor en el mutante $\Delta hbpA$ que en la cepa WT (**Figura 11A**). Los mutantes $\Delta hbpA$, $\Delta hitBC$ y Δhpe mostraron mayor expresión de todos o parte de los genes testados, sugiriendo un posible efecto negativo de HbpA, HitABC y PE sobre otros sistemas de captación de hemina a nivel de

expresión génica. Por el contrario, los mutantes $\Delta hxCBA$ y $\Delta sapAB$ presentaron menor expresión de *hbpA*, lo que sugiere un posible efecto positivo de HxCBA y SapABCDFZ sobre HbpA a nivel de expresión génica (ver resumen en **Figura 11B**). La expresión génica relativa también varió entre las cepas. Como ejemplo representativo, la **Figura 11C** muestra la expresión génica relativa en las cepas WT y $\Delta hbpA$.

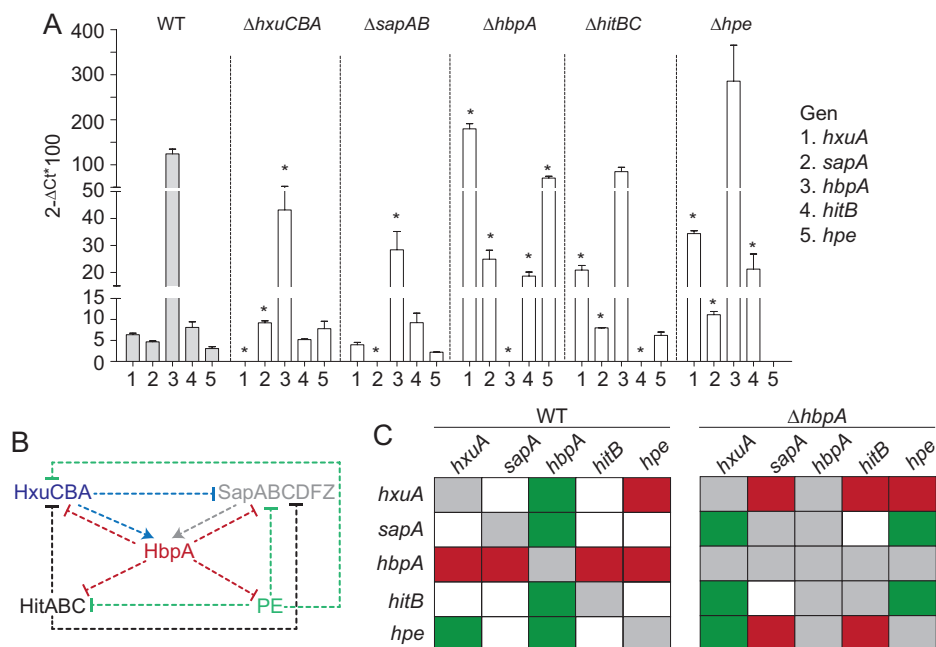


Figura 11. Expresión coordinada de genes que codifican sistemas de adquisición de Fe-hemina de HiNT. (A) Expresión de los genes *hxA*, *sapA*, *hbpA*, *hitB* y *hpe* en las cepas HiNT375 WT, $\Delta hxCBA$, $\Delta sapAB$, $\Delta hbpA$, $\Delta hitBC$ y Δhpe , crecidas en sBHI. En HiNT375 $\Delta hxCBA$, la expresión de *sapA* fue mayor, y la de *hbpA* menor, que en la cepa WT ($p=0.01$ y $p<0.05$, respectivamente). En HiNT375 $\Delta sapAB$, la expresión de *hbpA* fue menor que la mostrada por la cepa WT ($p=0.01$). En HiNT375 $\Delta hbpA$, la expresión de *hxA*, *sapA*, *hitB* y *hpe* fue mayor que la de la cepa WT (para *hxA* y *hpe*, $p<0.005$, para *sapA* y *hitB*, $p<0.05$). En HiNT375 $\Delta hitBC$, la expresión de *hxA* y *sapA* fue mayor que en la cepa WT ($p<0.05$ y $p<0.005$, respectivamente). En HiNT375 Δhpe , la expresión de *hxA*, *sapA* y *hitB* fue mayor que en la cepa WT ($p=0.001$, $p=0.01$, $p<0.05$, respectivamente). Comparación estadística, ANOVA de dos colas (LSD de Fisher no corregido). (B) Modelo de una posible coordinación de la expresión génica de sistemas de adquisición de Fe-hemina de HiNT. (C) Representación esquemática de la expresión comparada en las cepas HiNT375 WT y $\Delta hbpA$. Cada matriz corresponde a una cepa (WT, izquierda; $\Delta hbpA$, derecha). Las filas se utilizan como referencia; las columnas muestran la expresión de cada gen comparada con la del gen de referencia (ejemplo, en la cepa WT, la expresión de *hbpA* es mayor que la de *hxA*). Código de color: verde, aumento de expresión del gen X de una columna en comparación con la del gen Y de una fila; rojo, disminución de expresión del gen X de una columna en comparación con la del gen Y de una fila; blanco, sin diferencias significativas; gris, no determinado.

Estos resultados apoyan que la expresión de los genes que codifican la maquinaria de adquisición de Fe-hemina de HiNT responde a la disponibilidad de Fe, está regulada por Fur (**Tabla 2** y (Harrison et al., 2013; Whitby et al., 2006; Whitby et al., 2009)), y su actividad está posiblemente coordinada, con el sistema HbpA desempeñando jugando un papel prominente en este proceso.

1.4.3. Las proteínas SapA, HbpA y HxuA participan en la donación de hemina entre cepas de HiNT

SapA, HbpA y PE unen directamente hemina, mientras que HxuA participa indirectamente liberando el grupo hemo de la hemopexina, y haciéndolo accesible a HxuC (Al Jubair et al., 2014; Mason et al., 2011; Vergauwen et al., 2010; Zambolin et al., 2016). Además, PE es un reservorio de hemina en la superficie bacteriana, que puede donarse a otras células de *H. influenzae* privadas de hemina (Al Jubair et al., 2014). A continuación, cuestionamos si la observación descrita para PE es extensible a otras proteínas bacterianas que unen hemina. La donación interbacteria de hemina puede analizarse mediante cuantificación de la luminiscencia de una cepa receptora de hemina crecida en condiciones de depleción de hemina (HiNT3655*luxABCDE*) cocultivada con una cepa donadora, previamente crecida en presencia de hemina (Al Jubair et al., 2014). HiNT375 WT resultó ser un pobre donador de hemina, limitando el crecimiento de la cepa receptora a niveles no detectables (**Figura 12**).

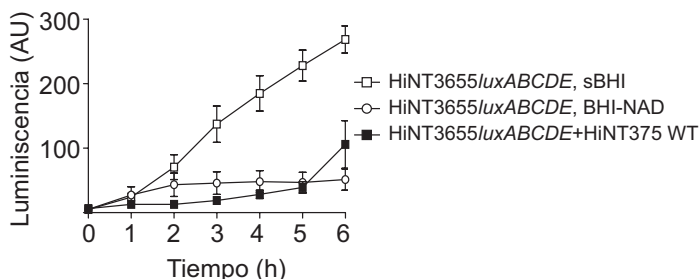


Figura 12. La donación de hemina por la cepa HiNT375 WT es limitada. El cocultivo de HiNT3655*luxABCDE* (cepa receptora) con HiNT375 WT (cepa donadora) no permitió el crecimiento de la receptora. Símbolos blancos, crecimiento de cepa receptora en sBHI (cuadrado), o BHI-NAD (círculo). Símbolos negros, crecimiento de cepa receptora en cocultivo con HiNT375 WT.

Sin embargo, *H. influenzae* RdKW20, portadora de los sistemas de adquisición de Fe-hemina en estudio (*hxuCBA*, HI0262_HI0263_HI0264; *sapABCDZFZ*, HI1638_HI1639_HI1640_HI1641_HI1642_HI1643; *hbpA*, HI0853; *hitABC*, HI0097_HI0098_HI0099; *hpe*, HI0178) (Fleischmann et al., 1995), resultó ser una eficiente donadora de hemina (**Figura 14A**). Debido a la limitación presentada por HiNT375 WT, se empleó RdKW20 como fondo genético en este análisis particular. El crecimiento de los mutantes RdKW20 Δ *hxuCBA*, RdKW20 Δ *sapAB*, RdKW20 Δ *hitBC* y RdKW20 Δ *hpe* en sBHI fue comparable al de la cepa WT (**Figura 13**).

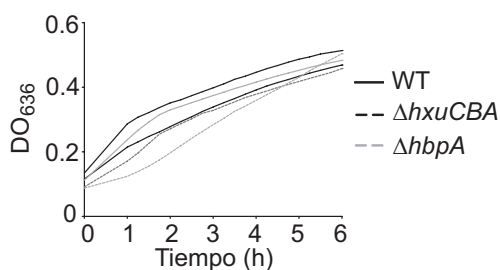


Figura 13. Crecimiento de las cepas RdKW20 WT, Δ *hxuCBA*, Δ *sapAB*, Δ *hbpA* y Δ *hitBC* en sBHI. Las líneas continuas grises corresponden con las cepas Δ *sapAB* y Δ *hitBC*, cuyo crecimiento fue comparable a la cepa WT.

Generamos cocultivos de HiNT3655*luxABCDE* (privada de hemina) y RdKW20 WT o cepas mutantes (crecidas en presencia de hemina). El crecimiento de HiNT3655*luxABCDE* fue mayor cuando se cocultivó con RdKW20 WT que con los mutantes RdKW20 Δ *sapAB*, RdKW20 Δ *hbpA* y RdKW20 Δ *hxuCBA* (**Figura 14A**). Este no fue el caso de RdKW20 Δ *hitBC* (**Figura 14A, panel derecho**), confirmando el papel del sistema HitABC como transportador de Fe pero no de hemina (Adhikari et al., 1995; Anderson et al., 2004; Sanders et al., 1994).

Las deficiencias observadas en la donación de hemina entre cepas pueden relacionarse con una menor unión de hemina a la superficie de las cepas mutantes que a la de la cepa WT, como se observó en la determinación de unión de hemina mostrada en la **Figura 14B**, y de acuerdo a observaciones previas (Mason et

al., 2011; Vergauwen et al., 2010; Zambolin et al., 2016). RdKW20 $\Delta hitBC$ mostró una ligera reducción en la unión de hemina, en menor grado que el mostrado por los mutantes en los que se inactivaron los sistemas *hxcuCBA*, *sapAB* y *hbpA* (Figura 14B).

Estos resultados muestran que la unión de hemina a SapA, HbpA y HxuA, pueden contribuir a su almacenamiento y/o donación. Así, extendemos las observaciones previas sobre la lipoproteína de membrana externa PE (Al Jubair et al., 2014) a la proteína de superficie HxuA, y a las proteínas periplásmicas SapA y HbpA. HitABC no fue considerado en los análisis posteriores de este trabajo.

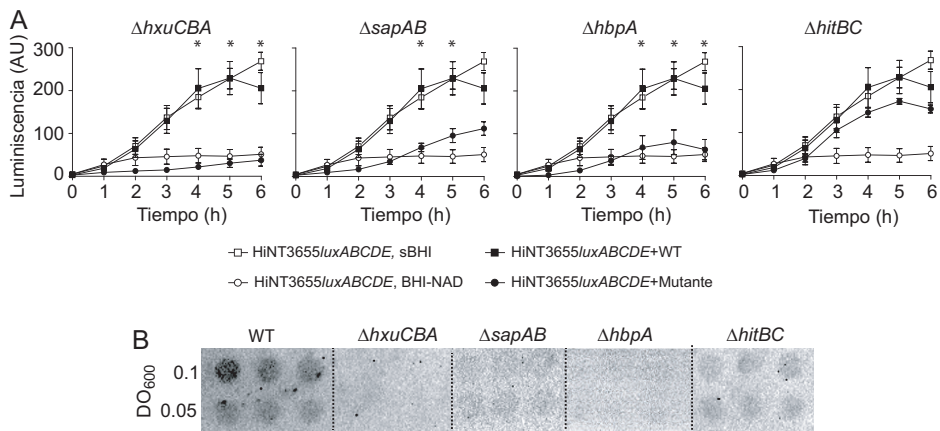


Figura 14. HxuCBA, SapABCDFZ y HbpA participan en la unión y donación de hemina entre bacterias. (A) HxuA, SapA y HbpA, pero no HitABC, participan en la donación de hemina entre bacterias. El cocultivo de HiNT3655*luxABCDE* con RdKW20 WT o $\Delta hitBC$ (panel derecho) produjo un crecimiento de la cepa receptora comparable al de HiNT3655*luxABCDE* en sBHI. Por el contrario, el cocultivo HiNT3655*luxABCDE* con $\Delta hxcuCBA$, $\Delta sapAB$ o $\Delta hbpA$ no permitió el crecimiento de la cepa receptora (véase 4, 5 y 6 h). Símbolos blancos, crecimiento de la cepa receptora en sBHI (cuadrado) o BHI-NAD (círculo). Símbolos negros, crecimiento de la cepa receptora en cocultivo con cepas WT (cuadrado) o mutante (círculo). *Diferencias significativas en la luminiscencia del cocultivo de la cepa receptora con cepas WT (cuadrado) o mutante (círculo). Los datos se muestran como unidades arbitrarias de luminiscencia (AU). Comparación estadística, ANOVA de dos colas (prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni). (B) Imágenes representativas de la determinación semicuantitativa de la unión de hemina a las cepas RdKW20 WT, $\Delta hxcuCBA$, $\Delta sapAB$, $\Delta hbpA$ y $\Delta hitBC$.

1.4.4. Base estructural de la unión de la molécula de hemina a las proteínas HbpA, SapA, PE y HxuA

Las características fenotípicas compartidas por HbpA, SapA, PE y HxuA

nos llevaron a investigar la base estructural de su unión a hemina. Usamos HADDOCK (DOCKing) (Meyer et al., 2016; van Zundert et al., 2016) para acoplar la molécula de hemina a estas proteínas. La **Tabla A6** muestra el resumen de los resultados de probabilidades de acoplamiento obtenidos.

Los modelos de homología de HbpA y SapA se construyeron en base al cristal de HbpA de *H. parasuis* (*HpHbpA*) en su forma de unión a glutatión (código APB 3M8U) (Vergauwen et al., 2010) usando I-TASSER (Meyer et al., 2016; Roy et al., 2010; van Zundert et al., 2016; Zhang, 2008). La secuencia de la región alineada fue 74% y 30% en HbpA y SapA, respectivamente. A pesar de la menor identidad de secuencia en el caso de SapA, los alineamientos de secuencia con HbpA, *HpHbpA* y DppA (proteína de unión a dipéptidos estructuralmente homóloga de *E. coli*, *EcDppA*) (Dunten & Mowbray, 1995) confirmaron una alta similitud (**Figura 15**), apoyando *HpHbpA* como una buena

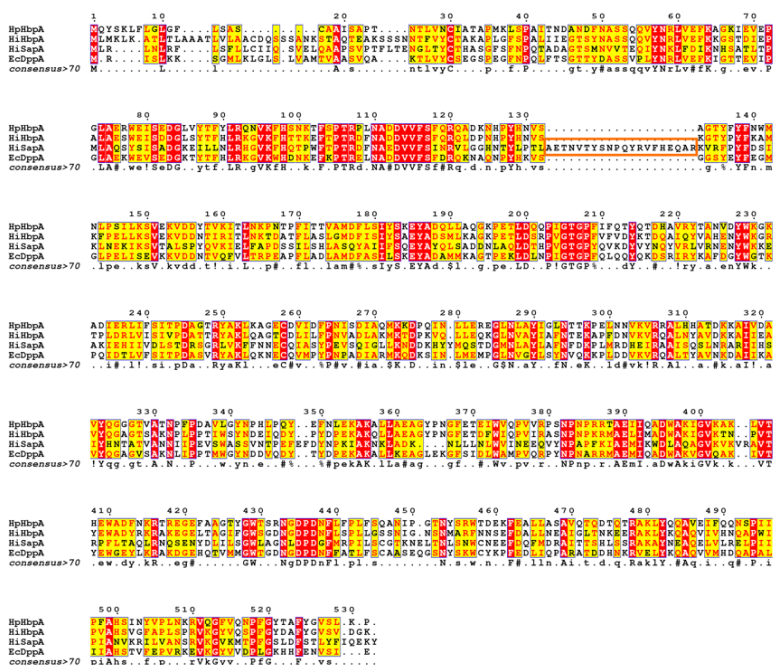


Figura 15. Alineamiento de secuencia de las proteínas de *HpHbpA*, *HiHbpA*, *HiSapA* y *EcDppA*. Las secuencias se alinearon usando el servidor T-Coffee (<http://tcoffee.org.cat>) con la opción Expresso (Notredame et al., 2000). El alineamiento se visualizó usando ESPrnt 3.0 (Robert & Gouet, 2014). En rojo, residuos conservados; en amarillo, residuos con una probabilidad de similitud >0.7.

referencia estructural para SapA y HbpA. Los residuos del sitio de unión de ligando predichos por el servidor COACH (Yang et al., 2013a; Yang et al., 2013b) fueron usados para impulsar el acoplamiento.

En el caso de HbpA, la solución de interacción con mayor probabilidad sugiere la unión de la molécula de hemina en una hendidura entre los dominios N- y C-terminal (**Figura 16**), similar a lo observado en *HpHdpA* y *EcDppA* (**Figura 17**). En SapA, la hemina se localiza en una ubicación similar, pero con ángulo diferente debido a la presencia de un bucle más largo (residuos 140-158, mostrados en naranja en la **Figura 16A-B**). Esta extensión no se conserva en

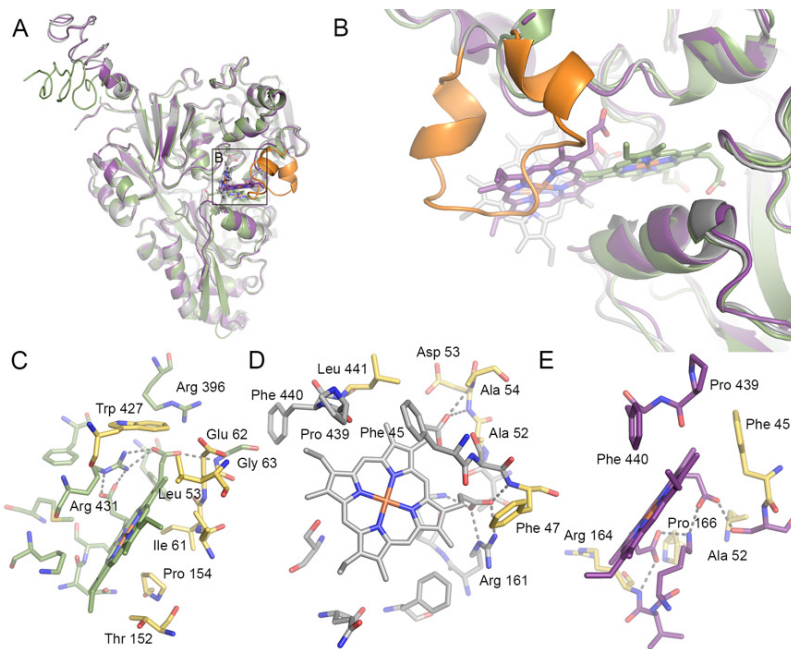


Figura 16. Predicción estructural de la unión de hemina a HbpA y SapA. Se empleó HADDOCK para realizar el acoplamiento de la molécula de hemina a los modelos de homología de HbpA (verde), SapA-variante completa (gris), SapA-variante truncada, donde se ha eliminado un bucle no conservado (púrpura) (residuos 140-158). Los residuos truncados se muestran en color naranja en SapA. **(A)** Superposición de las soluciones de unión de mayor probabilidad para HbpA, SapA y SapA truncado. **(B)** Ampliación de los sitios predichos de interacción con hemina, que muestra cómo se une a HbpA en un bolsillo de unión más profundo. En SapA-variante completa, el bucle no conservado (naranja) evita que la hemina se una en el mismo bolsillo. En SapA-variante truncada, el bolsillo es más accesible. Análisis LigPlot+ del sitio de interacción predicho en HbpA **(C)**, SapA-variante completa **(D)**, y SapA-variante truncada **(E)**, con residuos de los sitios de unión en representación de barras. Líneas discontinuas, enlaces de hidrógeno; amarillo, residuos comunes para los tres sitios de unión.

HbpA, *HpHbpA* y *EcDppA*, y parece ser única a SapA (**Figura 15**). Teniendo en cuenta que la posición de este bucle es especulativa debido a la ausencia de un cristal de referencia específico, lo eliminamos del modelo de SapA y repetimos la predicción de acoplamiento de ligando. En ausencia de este bucle, la unión de hemina se aproxima a lo observado en HbpA, si bien el sitio de interacción se localiza más cerca de la superficie de la proteína.

El análisis de los sitios de unión a hemina mediante LigPlot+ muestra enlaces de hidrógeno entre propionatos de hemina y cadenas laterales cargadas positivamente o nitrógenos de cadena principal (**Figura 16C-E**), así como la presencia de residuos hidrofóbicos alineados en los bolsillos para proporcionar fuerzas de Van der Waals con el resto de la hemina. A pesar de las diferencias en el modo de unión, se observaron varios residuos comunes en los tres sitios de unión de hemina (**Figura 16C-E**, residuos en amarillo). En el caso de HbpA, el sitio predicho apoya el sugerido previamente (Dunten & Mowbray, 1995), y la comparación de los sitios de unión al ligando en *HpHbpA* y *EcDppA* mostró la conservación de las posiciones Gly63, Arg396 y Trp446 (**Figura 17**).

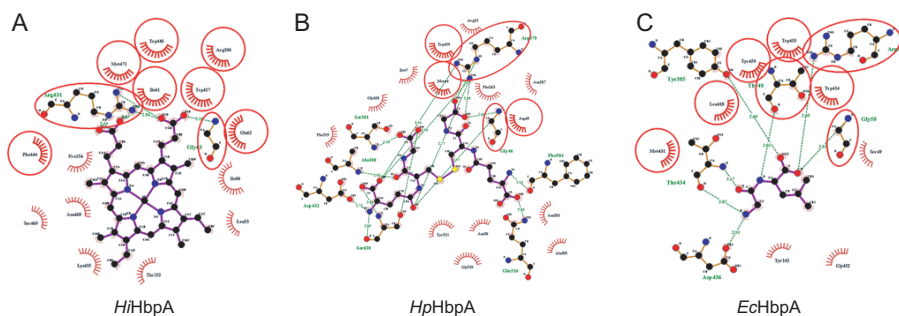


Figura 17. Comparación del sitio de unión de ligando en *HhHbpA*, *HpHbpA* y *EcDppA*. Análisis LigPlot+ de (A) solución de mayor probabilidad para la unión de hemina para *HhHbpA*; (B) cristal de *HpHbpA* interaccionando con glutatión; (C) *EcDppA* unido al dipéptido Gly-Leu. Círculos rojos, residuos comunes para los tres sitios de unión; líneas discontinuas verdes, enlaces de hidrógeno.

Evidencias previas mostraron que la molécula de hemina se une a PE a través de un bolsillo bien definido formado en la interfaz de su dímero (Al Jubair et al., 2014). El acoplamiento de hemina a PE (código PDB 3ZH5) usando HADDOCK

confirma este bolsillo como sitio de unión, con enlaces de hidrógeno formados entre propionatos de hemina y residuos polares en uno de los monómeros de PE (Asn98, Asn101, Thr105), así como fuerzas de Van der Waals con residuos hidrofóbicos en ambos lados (Ile65 e Ile96) (**Figura 18A-C**).

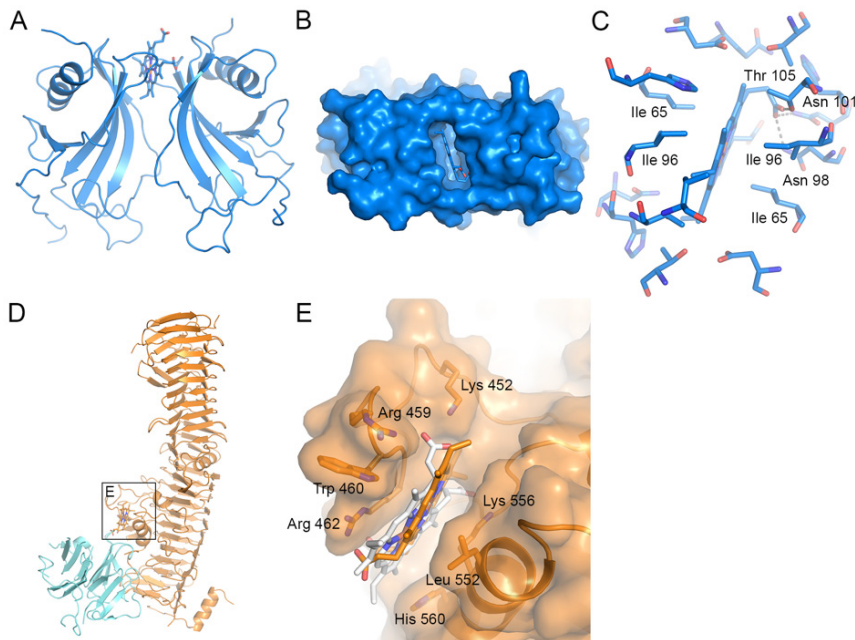


Figura 18. Predicción estructural de la unión de hemina a PE y HxuA. HADDOCK fue empleado para acoplar la molécula de hemina a los cristales de PE (PDB 3ZH5) y HxuA (PDB 4RM6). **(A)** Representación de la solución de interacción con mayor probabilidad para PE. **(B)** Igual que en **(A)**, vista desde la parte superior. **(C)** Análisis LigPlot+ del sitio de unión de hemina predicho, con residuos mostrados como barras. Línea discontinua, enlaces de hidrógeno. **(D)** Solución de unión hemina-HxuA con mayor probabilidad (amarillo). La hemopexina (cian) tomada del cristal del complejo HxuA-hemopexina (APB 4RT6) se muestra como referencia. **(E)** Detalle del sitio de unión de hemina predicho, mostrando las dos mejores soluciones de interacción (amarillo y blanco). Los residuos que recubren el bolsillo se muestran como barras.

Por último, tras el examen del cristal de HxuA (código PDB 4RM6) (Zambolin et al., 2016), identificamos un bolsillo en su superficie, cerca del sitio de unión a hemopexina, que mostró similitud con el sitio de unión de hemina en HbpA, con varios residuos cargados positivamente que pueden interactuar con los propionatos de hemina. La capacidad de este bolsillo para acomodar una molécula de hemina se investigó usando HADDOCK,

generando dos soluciones con puntuación de interacción similar (**Tabla A6**). Como se muestra en la **Figura 18D-E**, la molécula de hemina encaja bien en este bolsillo, con dos soluciones que difieren según los propionatos de hemina, y que apuntan hacia dentro o hacia fuera del bolsillo. En ambas soluciones, varios residuos cargados positivamente (Arg y/o Lys) están bien posicionados para interactuar con propionato a través de enlaces de hidrógeno.

En resumen, nuestros estudios computacionales proporcionan modelos 3D plausibles para la interacción de las proteínas HbpA, SapA, PE y HxuA con la molécula de hemina.

1.4.5. La expresión de los genes de adquisición de Fe-hemina de HiNT está regulada por los niveles de hemina disponibles

Las bacterias pueden sentir los niveles de hemina del medio como estrategia para alertar del contacto con tejidos de vertebrados, modulando así la expresión de los sistemas implicados en la adquisición y/o metabolismo del Fe-hemina (Skaar, 2010; Stauff & Skaar, 2009). En general, la expresión de estos genes aumenta en condiciones de restricción de Fe (Whitby et al., 2006; Whitby et al., 2009).

A continuación, analizamos si la expresión génica de los sistemas en estudio responde a la disponibilidad de hemina y, de ser así, si lo hace de forma coordinada. Para ello, las cepas HiNT375 WT y mutantes fueron crecidas en BHI-NAD o sBHI, para extracción de ARN y análisis mediante qRT-PCR. En HiNT375 WT, $\Delta hbpA$ y Δhpe , los niveles de expresión de los genes *hxuA*, *sapA* y *hpe* fueron mayores en BHI-NAD que en sBHI, sugiriendo su regulación positiva por depleción de hemina, de forma HbpA- y PE-independiente. En HiNT375 WT, $\Delta sapAB$ y Δhpe , los niveles de expresión del gen *hbpA* fueron menores en ausencia de hemina, sugiriendo que la expresión de *hbpA* está regulada negativamente por la depleción de hemina, de forma SapABCDFZ- y PE-independiente. Por el contrario, la inactivación de los genes *hxuCBA* y *sapAB*, modifica la expresión de *hxuA*, *sapA* y *hpe* asociada a la disponibilidad

de hemina, respecto a la cepa WT (**Tabla 3**).

Tabla 3. Expresión génica en HiNT375 WT y cepas mutantes, tras su crecimiento en BHI-NAD y en sBHI (BHI-NAD/sBHI).

Gen	Fold change, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (BHI-NAD/sBHI)				
	WT	$\Delta hxcBA$	$\Delta sapAB$	$\Delta hbpA$	Δhpe
<i>hxcA</i>	3.05*	ND ^a	0.49*	5.06*	4.41*
<i>sapA</i>	4.02*	1.47	ND	5.08*	3.21*
<i>hbpA</i>	0.18*	1.10	0.4*	ND	0.35*
<i>hpe</i>	7.62*	0.95	2.3	5.05*	ND

^aND, no determinado.

* $p < 0.05$, comparación estadística *t-test* de dos colas de media de valores (BHI-NAD vs sBHI).

Los resultados obtenidos sugieren que HxcCBA y SapABCDFZ, además de unión, almacenamiento y donación de hemina, también pueden participar en la detección de hemina, lo que a su vez parece tener un impacto en la expresión de otros sistemas de captación en respuesta a su disponibilidad en el medio.

1.4.6. La disponibilidad de hemina favorece la interacción de HiNT con el epitelio respiratorio humano

A continuación, analizamos si la unión-almacén de hemina por HiNT puede a su vez modular su interacción con el hospedador. Las cepas HiNT375 WT y mutantes fueron crecidas en BHI-NAD o sBHI, y empleadas para infectar células epiteliales. El crecimiento bacteriano en BHI-NAD produjo menor invasión epitelial por HiNT375 $\Delta hxcBA$, HiNT375 $\Delta sapAB$, HiNT375 $\Delta hbpA$ y HiNT375 Δhpe que por la cepa WT. En todos los casos, la depleción de hemina disminuyó la tasa de invasión. Sin embargo, el aumento de invasión epitelial por bacterias crecidas en sBHI vs BHI-NAD fue mayor en el caso de los mutantes (HiNT375 $\Delta hxcBA$, 17,5X; HiNT375 $\Delta sapAB$, 42X; HiNT375 $\Delta hbpA$, 22,3X; HiNT375 Δhpe , 18,5X) que de la cepa WT (4,5X) (**Figura 19A**). Asimismo, el crecimiento bacteriano en sBHI restauró parcialmente la invasión epitelial por HiNT375 $\Delta hxcBA$, HiNT375 $\Delta sapAB$, HiNT375 $\Delta hbpA$ y HiNT375 Δhpe (**Figura 19A**). Aunque en menor medida, se obtuvieron observaciones similares al evaluar la tasa de adhesión epitelial (**Figura 19B**).

Estos resultados sugieren que la unión de hemina por HiNT contribuye positivamente a la infección epitelial respiratoria. La disponibilidad de hemina restaura parcialmente las deficiencias asociadas a la inactivación de sistemas específicos de adquisición de Fe-hemina. Por último, la inactivación de estos sistemas y la ausencia de hemina en el medio pueden presentar efectos sinérgicos.

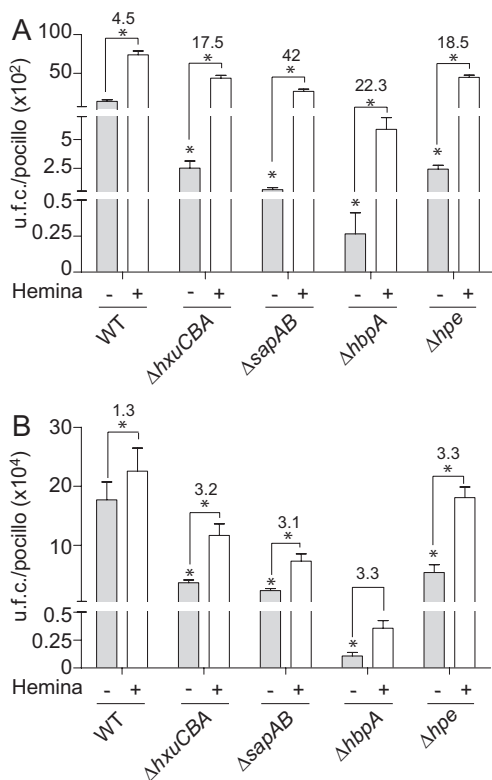


Figura 19. La inactivación de los sistemas de unión de Fe-hemina disminuye la interacción de HiNT con el epitelio respiratorio, y es dependiente de la disponibilidad de hemina. Se usaron neumocitos tipo II (línea celular A549) para cuantificar invasión (A) y adhesión (B) epitelial de HiNT375 WT, $\Delta hxcuCBA$, $\Delta sapAB$, $\Delta hbpA$ y Δhpe . (A) La depleción de hemina (barras grises) generó tasas de invasión menores en los mutantes que en la cepa WT ($\Delta hxcuCBA$, $p < 0.01$; $\Delta sapAB$, $p = 0.0001$; $\Delta hbpA$, $p = 0.0005$; Δhpe , $p < 0.001$). La disponibilidad de hemina incrementó las tasas de invasión, en comparación con las mostradas en ausencia de hemina (WT, $\Delta hxcuCBA$, $\Delta sapAB$ y Δhpe , $p < 0.0001$). Los números superiores indican el aumento de la invasión de cada cepa tras su crecimiento en sBHI vs BHI-NAD. (B) La depleción de hemina redujo la adhesión epitelial de las cepas mutantes, en comparación con la cepa WT ($p < 0.0001$). La disponibilidad de hemina aumentó el nivel de adhesión, respecto al mostrado en privación de hemina (WT, $p < 0.05$; $\Delta hxcuCBA$, $p = 0.0001$; $\Delta sapAB$, $p < 0.05$; Δhpe , $p < 0.0001$). Los números superiores indican el aumento de la adhesión de cada cepa tras su crecimiento en sBHI vs BHI-NAD. Datos expresados como u.f.c./pocillo. Comparación estadística, ANOVA de dos colas (prueba de comparaciones múltiples de Sidak).

1.4.7. El almacenamiento de hemina en la superficie bacteriana contribuye a prevenir su toxicidad

El exceso de hemina puede ser tóxico, y los patógenos invasores desarrollan estrategias para contrarrestar dicha toxicidad como componentes de su patogénesis (Anzaldi & Skaar, 2010). Las proteínas de unión a hemina pueden ser una estrategia de secuestro/almacenamiento y, por tanto, resistencia a la toxicidad (Choby & Skaar, 2016). Para analizar el papel del almacenamiento

y unión de hemina en la prevención de su toxicidad, se analizó la resistencia a H_2O_2 de las cepas HiNT375 WT y mutantes. Se utilizaron H_2O_2 6.25; 12.5; 25 y 50 μmol /disco de papel estéril. Si bien no se observaron diferencias entre cepas en las concentraciones menores de H_2O_2 , la inactivación de los sistemas *sapABCDFZ* y *hbpA* aumentó la inhibición del crecimiento bacteriano, en comparación con la cepa WT al emplear 50 μmol H_2O_2 /disco. No se observaron diferencias tras la inactivación de los sistemas *hxuCBA* y *hpe* (Figura 20).

Estos resultados sugieren que el almacenamiento periplásmico de hemina mediado por SapA y HbpA puede jugar un papel importante en el control de su toxicidad en *H. influenzae*.

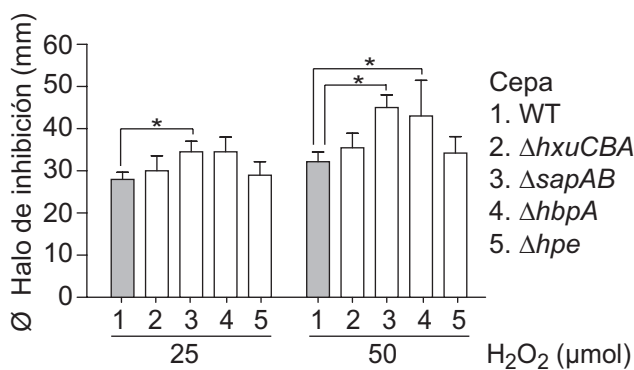


Figura 20. Implicación de los sistemas de captación de Fe-hemina en la prevención de toxicidad. HiNT375, cepas WT y mutantes, fueron crecidas en sBHI para generar biomasa que fue recogida y extendida en sHTM agar. Se midió el halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de discos de papel estériles empapados con H_2O_2 . Se observó mayor inhibición del crecimiento de los mutantes $\Delta sapAB$ y $\Delta hbpA$ que de la cepa WT (25 μmol H_2O_2 , $\Delta sapAB$, $p=0.01$; 50 μmol H_2O_2 , $p=0.0001$ y $p<0.0005$, respectivamente). Los datos se expresan como media \pm DE del diámetro de inhibición de crecimiento (mm). Comparación estadística, ANOVA de dos colas (prueba de comparaciones múltiples de Dunnett).

1.4.8. Contribución de proteínas de unión a hemina multifuncionales a la patogénesis de HiNT

Además de la inmunidad nutricional de hierro, HxuA, SapA, HbpA y PE se enfrentan a otras estrategias de defensa, mostrando propiedades multifuncionales. El sistema SapABCDFZ está implicado en la resistencia de HiNT a péptidos antimicrobianos y en la adquisición de potasio; HbpA es esencial para la

importación de glutatión; PE une proteínas de ECM (Mason et al., 2005; Mason et al., 2006; Raffel et al., 2013; Ronander et al., 2008; Ronander et al., 2009; Singh et al., 2013; Vergauwen et al., 2010). A continuación, analizamos la multifuncionalidad de HxuA, SapA, HbpA o PE en la infección pulmonar, además de en su papel en la infección epitelial (**Figuras 10 y 19**). Analizamos la contribución de estos sistemas a la resistencia de HiNT a PxE, como péptido antimicrobiano modelo. La inactivación de *hxcCBA*, *sapABCDFZ* y *hpe* redujo la CMI de este péptido antimicrobiano. Por el contrario, la inactivación del gen *hbpA* aumentó la resistencia bacteriana. Las cepas mutantes mostraron fenotipos relativos comparables en BHI-NAD o sBHI, si bien el crecimiento en sBHI aumento ligeramente la susceptibilidad a PxE (**Figura 21A**). Por otra parte, analizamos su contribución en la importación de glutatión, un tripéptido esencial que contiene L-cisteína (Morris et al., 2013; Sporer et al., 2017). *H. influenzae* es auxótrofo a cisteína y glutatión, e importa ambas moléculas del medio exterior. La cisteína y el glutatión exógeno, y sus formas oxidadas cistina y GSSG, generan un crecimiento de *H. influenzae* comparable (Vergauwen et al., 2010). El empleo de CDMM suplementado con cistina mostró crecimiento bacteriano en todos los casos. Por el contrario, el empleo de CDMM suplementado con GSSG no permitió el crecimiento de HiNT375 Δ *hbpA*. El crecimiento de HiNT375 Δ *sapAB* fue inferior al de la cepa WT, pero comparable en CDMM suplementado con cistina o GSSG (**Figura 21B**).

Por tanto, además de unión-almacenamiento-donación de hemina e infección epitelial, HxcCBA, SapABCDFZ y PE están implicados en resistencia a péptidos antimicrobianos, y HbpA en la importación de glutatión, lo que confirma la multifuncionalidad de estos sistemas.

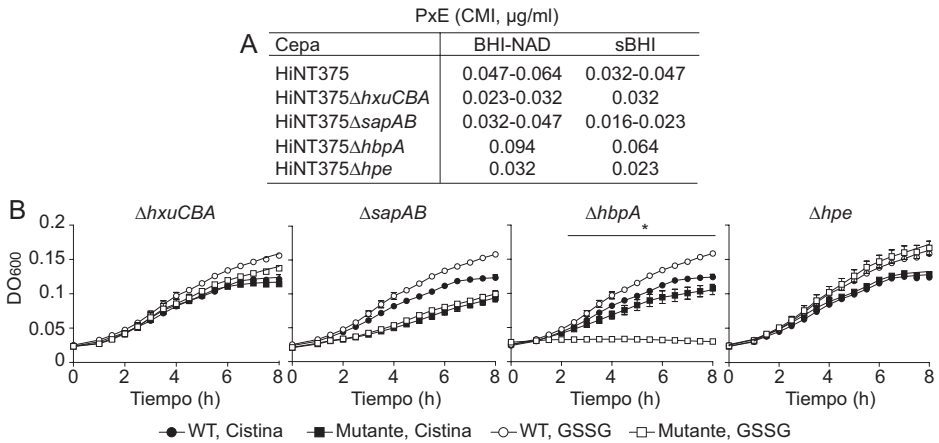


Figura 21. Multifuncionalidad de los sistemas de adquisición de Fe-hemina. (A) HxcuCBA, SapABCDFZ y PE participan en la resistencia de HiNT a PxE. Los mutantes Δ *hxcuCBA*, Δ *sapAB* y Δ *hpe* muestran menor CMI que la cepa WT. Por el contrario, la inactivación del gen *hbpA* aumentó dicha CMI. (B) HbpA, pero no HxcuCBA, SapABCDFZ o PE, participa en la importación de glutatión de HiNT. Las bacterias se cultivaron en CDMM suplementado con cistina o GSSG. CDMM + cistina permitió crecimiento bacteriano en todos los casos. El crecimiento de HiNT375 Δ *hbpA* fue menor en CDMM + GSSG que en CDMM + cistina (a 2.5 h, $p < 0.05$; 3 h, $p < 0.001$; de 3.5 a 8 h $p < 0.0001$). Comparación estadística de las medias, ANOVA de dos colas (prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

Capítulo 2

La inactivación de la timidilato sintetasa ThyA de *Haemophilus influenzae* modula la resistencia antibiótica y su interacción con el sistema respiratorio

El contenido de este Capítulo se recoge íntegramente en la publicación (Rodríguez-Arce et al., 2017)

2.1. Resumen

El tratamiento antibiótico con TxS, combinación de TMP y SMX, genera resistencia por desarrollo de auxotrofia a timidina asociada a mutaciones inactivantes del gen *thyA*, que codifica la enzima timidilato sintetasa ThyA; lo que a su vez puede modificar la biología de la infección. El aumento de la frecuencia de resistencia a TxS en HiNT limita su idoneidad como tratamiento de elección frente a exacerbaciones asociadas a esta bacteria en pacientes EPOC, si bien su relación con la auxotrofia a timidina es poco conocida.

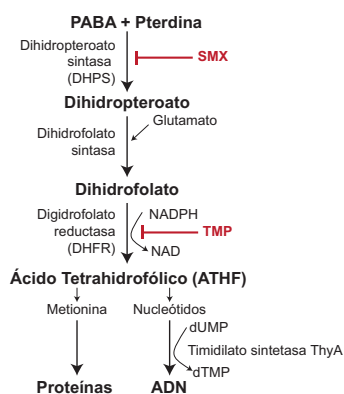
En este Capítulo, analizamos 2.542 aislados clínicos de HiNT recogidos en el Hospital Universitario de Bellvitge (HUB, España) en el periodo 2010-2014. Identificamos 119 cepas que mostraron crecimiento lento en medio MH-F agar, un medio con baja concentración de timidina, incluyendo una cepa auxótrofa a timidina aislada de una muestra de esputo de un paciente EPOC tratado con TxS. Para analizar el impacto de la auxotrofia a timidina en la relación HiNT-sistema respiratorio, generamos cepas de *H. influenzae* mutantes en el gen *thyA*. La inactivación de *thyA* aumenta la resistencia a TxS, y modifica la morfología bacteriana por alteración de la división celular, modifica la capacidad autoagregativa, los niveles de ChoP en superficie, el depósito de C3b, y los patrones de infección del epitelio respiratorio por HiNT. La presencia de timidina exógena disponible para la bacteria compensa dicha auxotrofia y el efecto del TxS, aspecto potencialmente facilitado por un transportador de nucleósidos codificado por el gen *nupC*. La inactivación de *thyA* atenúa la virulencia de *H. influenzae*, si bien también disminuye la eficacia del tratamiento con TxS *in vivo*.

En conjunto, los resultados obtenidos en el Capítulo 2 de este trabajo de Tesis Doctoral indican que la auxotrofia a timidina modula la interacción de HiNT con el sistema respiratorio y la resistencia de esta bacteria al TxS, por lo que sus efectos deben considerarse en la práctica clínica durante la administración de este antibiótico.

2.2. Introducción

HiNT es un patógeno oportunista responsable, entre otros, de procesos de exacerbación de pacientes EPOC (Agrawal & Murphy, 2011). Estos periodos de agudización de los síntomas impactan negativamente en la calidad de vida de los pacientes, siendo una causa frecuente de intervención clínica y hospitalización. Las exacerbaciones agudas asociadas a la EPOC son causadas principalmente por infecciones bacterianas o víricas (Sethi et al., 2010), por lo que la terapia antibiótica se prescribe de forma rutinaria. Los antibióticos amoxicilina, tetraciclinas o TxS, son administrados a pacientes EPOC exacerbados, lo que favorece la frecuencia de aparición de resistencias en patógenos respiratorios como HiNT, para el que la elección de antibióticos adecuados es un reto.

TxS es una combinación de TMP y SMX, que interfiere con el metabolismo y la replicación bacteriana bloqueando la producción de ATHF. El ATHF es un cofactor de la timidilato sintetasa, una proteína codificada por el gen *thyA*, requerida para la conversión de timidina en uracilo. El dihidrofolato es reducido a ATHF por la dihidrofolato reductasa (DHFR), codificada por el gen *folH*, también conocido como *drfA* o *folA*. La inhibición de la producción de ATHF previene la síntesis de timidina y, por tanto, la replicación de ADN, causando muerte bacteriana y susceptibilidad a TxS (**Figura 22**). TMP es un sustrato análogo al dihidrofolato y bloquea su reducción a ATHF, y SMX es análogo al ácido para aminobenzoico (PABA) que bloquea la dihidropteroato sintetasa (DHPS), codificada por el gen *folP*, que participa en la producción de dihidropteroato, un precursor del dihidrofolato. Tanto TMP como SMX tienen poca toxicidad para los humanos porque el ácido fólico es obtenido de la dieta (Tristram et al., 2007). En HiNT, la resistencia a TxS está asociada a (i) polimorfismos y/o inserciones cortas en los genes *folH* y *folP*; (ii) sobreproducción de DHFR; (iii) adquisición de los genes *sul1* y *sul2* (de Groot et al., 1988; de Groot et al., 1996; Enne et al., 2002). Existen evidencias que relacionan la resistencia de *H. influenzae* a TMP con un estado transitorio de auxotrofia a timidina en cepas aisladas de esputo de pacientes con bronquitis crónica previamente tratados con TMP (Platt et al., 1983); sin embargo, no existe información sobre la generación



resistencia a TxS asociada a la auxotrofia a timidina ni de sus consecuencias en la patogénesis de HiNT.

Figura 22. Mecanismo de acción del cotrimoxazol. TxS, combinación de TMP y SMX, bloquea secuencialmente la síntesis de ácido tetrahidrofólico (ATHF), cofactor de la timidilato sintetasa ThyA, requerida para la conversión de timidina en uracilo; interfiriendo con el metabolismo y la replicación bacteriana. SMX, análogo del ácido para aminobenzoico (PABA), inhibe de la dihidropteroato sintetasa (DHPS); y TMP, análogo del dihidrofolato, la dihidrofolato reductasa (DHFR).

En este trabajo, analizamos el crecimiento de 2.542 cepas de HiNT aisladas en el HUB entre 2010 y 2014, e identificamos 119 aislados que generaron colonias pequeñas de crecimiento lento en MH-F agar, un medio con baja concentración de timidina. Esta observación nos llevó a hipotetizar sobre la relación entre crecimiento lento, auxotrofia a timidina y resistencia a TxS asociada a la administración del antibiótico, en cuyo caso la auxotrofia podría modificar también la dinámica de la interacción HiNT-sistema respiratorio humano. En este contexto, realizamos un escrutinio de auxótrofos en los aislados HiNT con crecimiento reducido en MH-F agar, e identificamos una cepa auxótrofa a timidina, si bien dicha auxotrofia fue fácilmente reversible. Para explorar el establecimiento de asociaciones entre auxotrofia a timidina e infección respiratoria por *H. influenzae*, empleamos dos cepas con genomas completos disponibles, HiNT375 y RdKW20 (Fleischmann et al., 1995; Mell et al., 2014); para generar auxótrofos a timidina mediante mutación del gen *thyA* y evaluar su efecto en: (i) resistencia a TxS, morfología, crecimiento, autoagregación y expresión génica; (ii) interacción HiNT-hospedador en relación con el sistema de complemento y la infección de células epiteliales en cultivo; (iii) infección *in vivo* por HiNT, mediante un modelo de infección intranasal murino tras tratamiento con TxS.

Los resultados obtenidos proporcionan evidencias de la emergencia de resistencia a TxS en HiNT tras el tratamiento con este antibiótico, muestran el

papel de la timidilato sintetasa ThyA, en la fisiología y virulencia de HiNT, y ofrecen información para mejorar el uso de TxS frente a la infección respiratoria por HiNT.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas, plásmidos y cebadores utilizados en el Capítulo 2 de este trabajo de Tesis Doctoral se describen en **Anexo I (Tablas A2, A3 y A4)**. HiNT fue crecido a 37°C, 5% CO₂ en agar chocolate (Biomérieux), MH-F agar (Biomérieux) o sBHI agar (Oxoid). En líquido, HiNT se creció en sBHI (37°C, 5% CO₂). La timidina (*Thymidine*, Thy) (Sigma-Aldrich) se disolvió en agua destilada estéril (solución madre, 10 mg/ml). Cuando fue necesario, el medio fue suplementado con timidina mediante (i) uso de discos estériles impregnados en Thy 300 µg/ml o 10 mg/ml; (ii) adición de timidina 300 µg/ml en placa, en 20 ml de agar chocolate o MH-F agar; (iii) adición de timidina 300 µg/ml en sBHI. Se emplearon Erm₁₁ o Spec₅₀, cuando fue necesario. Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en LB a 37°C, con Amp₁₀₀, Erm₁₅₀ o Spec₅₀, cuando fue necesario.

Para la inactivación del gen *thyA*, se amplificó un fragmento de ADN incluyendo el gen *thyA* y sus regiones adyacentes (2.852 pb) con *Phusion* polimerasa (Thermofisher), usando como molde ADN genómico de la cepa HiNT375, y los cebadores *thyA*-F1 y *thyA*-R1. Este producto de amplificación fue clonado en el vector pJET1.2 (Thermofisher), generando pJET1.2-*thyA*, a su vez empleado como molde en una reacción de PCR inversa con *Phusion* polimerasa y los cebadores *thyA*-F2 y *thyA*-R2. Así, se generó la delección de un fragmento de 226 pb (nucleótidos 312-537 en la secuencia de *thyA*). Este vector como fue empleado para el clonaje de un *cassette* de resistencia a Erm escindido mediante digestión *Sma*I del plásmido pBSLerm (Allen et al., 2005); generando pJET1.2-*thyA*::ermC. Este plásmido fue utilizado como molde para amplificar el *cassette* de disrupción *thyA*::ermC con los cebadores *thyA*-F1 y *thyA*-R1, que fue utilizado para la transformación natural de HiNT375 o RdKW20

mediante el método MIV (Herriott et al., 1970). Los clones transformantes fueron seleccionados en sBHI agar con Erm_{11} para obtener $HiNT375\Delta thyA$ y $RdKW20\Delta thyA$, respectivamente. Los mutantes generados fueron confirmados mediante extracción de ADN genómico y amplificación con cuatro pares de cebadores: (i) $thyA$ -F1 y $thyA$ -R1, producto de amplificación, 3.814 pb; (ii) $thyA$ -F1 y pBSLerm-down, producto de amplificación, 2.421 pb; (iii) pBSLerm-up y $thyA$ -R1, producto de amplificación, 2.190 pb; (iv) pBSLerm-up y pBSLerm-down, producto de amplificación, 797 pb. Los productos de amplificación fueron secuenciados con los cebadores $thyA$ -F1, pBSLerm-up, pBSLerm-down y $thyA$ -R1. Cuando fue necesario, el gen $thyA$ fue amplificado con los cebadores ThyA_Pro_F y ThyA_R2, para la secuenciación de ADN.

Para la inactivación de $nupC$, dicho gen y sus respectivas regiones adyacentes (2.664 pb) fueron amplificados con *Phusion* polimerasa, utilizando ADN genómico de la cepa RdKW20 y los cebadores $nupC$ -F1 y $nupC$ -R1. Este producto de amplificación fue clonado en pJET1.2, generando pJET1.2- $nupC$. A continuación, un *cassette* Spec^R fue amplificado utilizando como molde pRSM2832 y los cebadores específicos de mutagénesis $nupC$ -F2 y $nupC$ -R2, siguiendo (Tracy et al., 2008). Los cebadores fueron diseñados para la eliminación de las secuencias comprendidas entre el codón de inicio y los siete últimos codones de $nupC$. *E. coli* SW102 fue coelectroporada con pJET1.2- $nupC$ (Amp^R, 50 ng) y el *cassette* de mutagénesis específico de $nupC$ (Spec^R, 200 ng) (Sinha & Detsky, 2012). Los clones portadores del plásmido resultante de recombinación pJET1.2- $nupC$::spec fueron seleccionados en LB agar con Amp₁₀₀ y Spec₅₀. Este plásmido fue utilizado como molde para amplificar el *cassette* de disrupción $nupC$::spec con los cebadores $nupC$ -F1 y $nupC$ -R1, utilizado para transformación natural de HiNT375 y RdKW20 mediante el método MIV. Los clones transformantes se seleccionaron en sBHI Spec₅₀, para obtener las cepas $HiNT375\Delta nupC$ y $RdKW20\Delta nupC$.

2.3.2. Escrutinio de aislados clínicos de *H. influenzae* auxótrofos a timidina

Los archivos de laboratorio del Servicio de Microbiología del HUB

(Barcelona, España) registraron la dificultad ocasional de HiNT para crecer en el MH-F+5% sangre de caballo desfibrada y 20 mg/l NAD, empleado de forma rutinaria para la determinación de perfiles de resistencia antibiótica. Se realizó un escrutinio de aislados de HiNT auxótrofos a timidina basado en su crecimiento deficiente en MH-F agar, y recuperación de dicha auxotrofia mediante crecimiento en MH-F agar alrededor de discos de papel estériles impregnados en timidina.

2.3.3. Susceptibilidad bacteriana a TxS en condiciones no estandarizadas

Las cepas auxótrofas a timidina no crecen correctamente en MH-F agar, lo que dificulta la determinación de susceptibilidad antibiótica mediante métodos convencionales. Por ello, no se emplearon técnicas de disco-difusión (Becton Dickinson), *E-test* (Biomerieux) o microdilución en MH-F agar, tal y como se especifica en *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints). Para la determinación de CMI, las cepas crecidas en agar chocolate 16 h, fueron utilizadas para generar suspensiones normalizadas en PBS a $DO_{600}=1$, que se extendieron en agar chocolate o MH-F agar en presencia de tiras *E-test* o discos de TxS (23.75 mg/1.25 mg SMX:TMP), y se incubaron durante 24 h para evaluar la dimensión del halo de inhibición de crecimiento.

2.3.4. Curvas de crecimiento bacteriano

Las cepas de HiNT cultivadas en agar chocolate durante 16 h se inocularon en 20 ml sBHI (2-5 colonias), con o sin timidina 300 $\mu\text{g/ml}$, y se incubaron durante 11 h en agitación. Los cultivos se diluyeron en 40 ml de sBHI, con o sin timidina 300 $\mu\text{g/ml}$, a $DO_{600}=0.01$ (RdKW20) o $DO_{600}=0.05$ (HiNT375), y se incubaron con agitación. Se registró la DO_{600} cada hora durante 8 h. Para la cuantificación de la viabilidad bacteriana, se tomaron alícuotas cada 2 h, se realizaron diluciones seriadas y plaqueo en sBHI agar. Los resultados se muestran como DO_{600} y u.f.c./ml. En el último tiempo monitorizado (8 h), se colocaron 10 μl de cada cultivo bacteriano sobre cubreobjetos de vidrio, se fijaron con

paraformaldehído (PFA) 3.7% en PBS pH 7.4 durante 15 min a temperatura ambiente (TA), y las bacterias se tiñeron con un anticuerpo (Ac) primario policlonal de conejo anti-HiNT diluido 1:600, y un Ac secundario burro anti-conejo conjugado con Cy2 (Jackson Immunological), diluido 1:100. Las muestras se analizaron con un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axioskop 2 plus y una cámara monocroma Carl Zeiss Axio Cam MRm.

2.3.5. Microscopía confocal

Las cepas de HiNT se cultivaron en agar chocolate durante 16 h, en ausencia o presencia de timidina 300 µg/ml. A continuación, la biomasa de una colonia se extendió sobre una gota de H₂O destilada en un portaobjetos de vidrio. Las gotas se secaron a TA, las bacterias se tiñeron durante 15 min en oscuridad con SYTO 9 (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se lavaron dos veces con H₂O destilada. Las imágenes fueron adquiridas aleatoriamente con un microscopio confocal Leica TCS-SL (Leica Microsystems) equipado con un láser de argón de 488 nm, láseres He/Ne de 543 nm y 633 nm (Centers Científics i Tecnològics-Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, España), utilizando un objetivo de inmersión 63x (apertura numérica de 1.4) y una resolución de imagen de 1024x1024 píxeles, y se analizaron utilizando Leica Confocal Software 2.5 (Leica Microsystems).

2.3.6. Microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM)

Bacterias previamente crecidas en agar chocolate fueron colocadas en rejillas recubiertas de Formvar y secadas al aire, para su posterior tinción negativa con ácido fosfotúngstico 1% en agua destilada durante 10 segundos. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 (JEOL) equipado con una Cámara Orius con dispositivo SC1000 (CCD) acoplado a carga (Gatan) a 80 kilovatios (kV), según (Remuzgo-Martinez et al., 2015).

2.3.7. Extracción de ARN y análisis de expresión génica mediante qRT-PCR

Las cepas de HiNT se crecieron en agar chocolate durante 16 h. A continuación, se inocularon de 2-5 colonias en 20 ml sBHI, en presencia o ausencia de timidina 300 $\mu\text{g/ml}$. Los cultivos se crecieron durante 11 h en agitación, se diluyeron en 40 ml sBHI a $\text{DO}_{600}=0.05$, en ausencia o presencia de timidina 300 $\mu\text{g/ml}$, y se crecieron hasta $\text{DO}_{600}=0.6$. En este punto, se preservó material para extracción de ARN con el reactivo TRIzol (Invitrogen). La calidad del ARN purificado fue evaluada con RNA 6000 Nano LabChips (Agilent 2100 Bioanalyzer). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir del ARN total (1 μg) con transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen), que fue a su vez empleado como molde para qRT-PCR con Thermo Scientific Luminaris HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Scientific). El análisis de resultados se realizó con BioRad CFX96 qPCR System (Bio-Rad). Las cantidades relativas de ARNm se calcularon con el método de Ct y se normalizaron usando ARN ribosómico 16S como control endógeno. Los cebadores se diseñaron con el programa *Primer3* y se detallan en el **Anexo I (Tabla A4)**: para *nupC*, *nupC*-RT-Fw y *nupC*-RT-Rv; para *tdk*, *tdk*-RT-Fw y *tdk*-RT-Rv; para ARN ribosómico 16S, 16S-Fw y 16S-Rv. Los datos se muestran como expresión relativa en cepa mutante respecto a cepa WT (considerados como 1). Todas las extracciones-amplificaciones se realizaron por duplicado, en al menos tres ocasiones ($n \geq 6$).

2.3.8. Autoagregación bacteriana

Bacterias crecidas en agar chocolate durante 16 h fueron inoculadas en 20 ml sBHI (3-4 colonias) y crecidas durante 11 h con agitación, en presencia o ausencia de timidina 300 $\mu\text{g/ml}$. El cultivo resultante fue diluido en sBHI a $\text{DO}_{600}=1$ y mantenido estáticamente a TA durante 5 h (volumen inicial ~ 25 ml). La viabilidad bacteriana se comprobó al comienzo de cada experimento (tiempo=0) mediante diluciones seriadas y plaqueo en sBHI agar. Se monitorizó la DO_{600} de la parte superior de cada cultivo cada hora, durante 5 h. Se realizaron al menos, cuatro experimentos independientes ($n \geq 4$).

2.3.9. Cuantificación de ChoP

Tras crecimiento en agar chocolate durante 16 h, se inocularon 3-4 colonias de HiNT en 20 ml sBHI para su crecimiento durante 11 h, y a continuación se diluyeron en 40 ml sBHI a $DO_{600}=0.05$, en ausencia o presencia de timidina 300 $\mu\text{g/ml}$, hasta $DO_{600}=0.6$. En este punto, se cuantificó la carga bacteriana mediante diluciones seriadas y plaqueo en sBHI agar, y se preservaron alícuotas a -80°C en sBHI con 20% glicerol. Para la determinación de ChoP, se emplearon alícuotas descongeladas con $\sim 1 \times 10^7$ u.f.c., que fueron incubadas durante 1 h a 37°C con el Ac monoclonal de ratón anti-ChoP TEPC-15 (Sigma-Aldrich) diluido 1:25 en PBS-Tween 20 0.05%. Las muestras se lavaron dos veces con PBS-Tween 20 0.05%, y se incubaron con suero inmune de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Serotec) diluido 1:300 en PBS-Tween 20 0.05%, durante 30 min a 4°C y en oscuridad. Las muestras se lavaron con PBS-Tween 20 0.05%, se fijaron en PFA 3% durante 2-3 min a TA, y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) usando parámetros de dispersión de al menos 25.000 bacterias. Los resultados se expresan como porcentaje del índice de fluorescencia relativo (RFI), para medir la proporción de bacterias fluorescentes ChoP⁺ (Ramos-Sevillano et al., 2015). Los ensayos se realizaron por cuadruplicado en al menos, tres ocasiones independientes ($n \geq 12$).

2.3.10. Unión de factores de complemento a HiNT

Las cepas bacterianas se crecieron como se indica en la **sección 2.3.9.**, y la deposición de C3b se analizó según (Ramos-Sevillano et al., 2015). Para ello, se opsonizó una suspensión bacteriana con $\sim 1 \times 10^7$ u.f.c. con suero humano diluido 1:4 en PBS-Tween 20 0.05%, y la deposición de C3b fue cuantificada mediante incubación con un Ac policlonal cabra anti-C3b conjugado con FITC (ICN-Cappel), diluido 1:300 en PBS-Tween 20 0.05%, durante 30 min a 4°C y en oscuridad.

La unión de CRP a la superficie bacteriana se cuantificó según (Ramos-Sevillano et al., 2015), incubando $\sim 1 \times 10^7$ u.f.c. con suero humano diluido 1:4 en PBS-Tween 20 0.05%, para su posterior detección con un Ac policlonal de conejo anti-CRP (Calbiochem), con el que se incubó durante 1 h a 37°C , seguido

de dos lavados con PBS-Tween 20 0.05%, e incubación posterior durante 30 min con un Ac policlonal de cabra anti-conejo conjugado con FITC en PBS-Tween 20 0.05%, durante 1 h a 37°C. En ambos casos, las bacterias se lavaron finalmente con PBS-Tween 20 0.05%, se fijaron con PFA 3%, y se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur, como se describe anteriormente. Los resultados se expresan como RFI. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y al menos, en tres ocasiones independientes ($n \geq 12$).

2.3.11. Cultivo celular e infección bacteriana

Las células epiteliales alveolares humanas A549 (ATCC CCL-185) se mantuvieron y prepararon como se indica en la **sección 1.3.8**. Las células epiteliales de carcinoma humano pulmonar mucopidermoide NCI H-292 (ATCC CRL-1848) se mantuvieron según (Euba et al., 2015c). Previo a la infección, se sembraron 4×10^5 células/pocillo durante 16 h. Los ensayos de adhesión e invasión se realizaron según la sección **sección 1.3.8**. Para ello, se prepararon suspensiones bacterianas normalizadas en PBS ($DO_{600} = 1$) a partir de cepas HiNT crecidas en agar chocolate durante 16 h, o crecidas en 20 ml sBHI durante 11 h, en ausencia o presencia de timidina 300 $\mu\text{g/ml}$. Se utilizó una MOI $\sim 100:1$. Para analizar la adhesión epitelial, las células se infectaron durante 30 min (Morey et al., 2011); para analizar la invasión epitelial, las células se infectaron durante 2 h, se lavaron tres veces con PBS, se incubaron 1 h en RPMI 1640 suplementado con STF 10%, Hepes 10 mM y gentamicina 200 $\mu\text{g/ml}$.

Cuando fue necesario, células A549 se infectaron durante 30 min con suspensiones bacterianas ($DO_{600} = 1$) generadas a partir de bacterias crecidas en agar chocolate, en ausencia o presencia de timidina 300 $\mu\text{g/ml}$. Las infecciones se realizaron en RPMI 1640, en ausencia o presencia de C3 purificado (16 $\mu\text{g/ml}$), 2% suero humano (*Human Serum*, HS) deficiente en C3, o HS reconstituido con C3 purificado (Sigma-Aldrich). A continuación, los pocillos se lavaron tres veces con PBS, las células se lisaron con 300 μl PBS-saponina 0.025% durante 10 min a TA, se realizaron diluciones seriadas y plaqueo en sBHI agar. Las infecciones se realizaron por triplicado al menos, tres veces ($n \geq 9$). Los

resultados se expresan como u.f.c./ml.

2.3.12. Secreción de IL-8

Se generaron suspensiones bacterianas en PBS ($DO_{600}=1$) a partir de cepas crecidas en agar chocolate, en ausencia o presencia de timidina 300 $\mu\text{g/ml}$, y se usaron para infección de células A549 durante 2 h con MOI $\sim 100:1$ (para más detalle, ver **sección 1.3.9.**). Las infecciones se realizaron por duplicado y al menos, dos veces ($n \geq 4$). Los resultados se expresan en IL-8 pg/ml.

2.3.13. Microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy, SEM*)

Se sembraron células A549 en cubreobjetos de vidrio y se infectaron con bacterias crecidas en agar chocolate, siguiendo el protocolo descrito en la sección **1.3.8.** Las muestras se fijaron en glutaraldehído 3% enfriado en hielo durante 20 min a 4°C, se deshidrataron con pases de acetona, se secaron por el método del punto crítico, se recubrieron con oro en un pulverizador iónico de capa fina JFC-1100 226 (JEOL, Ltd), y se observaron con un microscopio Inspect S (FEI Company) trabajando a 15 ó 20 kV (Lazaro-Diez et al., 2016).

2.3.14. Infección pulmonar murina

Se utilizó el modelo de infección pulmonar de ratón CD1 por HiNT, tal y como se indica en la **sección 1.3.10.** Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos ($n=5$): (i) control, solución vehículo (0.1 ml PBS) administrado por sonda oro-esofágica (Popper & Sons Inc.); (ii) TxS (Septrin, 8 mg/40 mg/ml TMP: SMX), cada 6 h, administrado por sonda oro-esofágica, comenzando a 6 hpi. Tratamiento con TxS: 960 mg/kilogramo (kg) de peso corporal en 0.1 ml de PBS. Para la infección respiratoria, se usaron las cepas HiNT375 y HiNT375 $\Delta thyA$, crecidas previamente en agar chocolate, en ausencia o presencia de timidina 300 $\mu\text{g/ml}$. Para la infección intranasal, se colocaron 40 μl de una suspensión bacteriana con $\sim 5 \times 10^8$ u.f.c./ml ($\sim 2 \times 10^7$ u.f.c./ratón) en la entrada de las fosas nasales hasta su inhalación completa por ratones previamente anestesiados con

ketamina-xilazina (3:1). Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a 12, 24 y 48 hpi. Las muestras de LBA fueron adquiridas y procesadas como se especifica en la **sección 1.3.10**. Los resultados se expresan como media \pm DE de \log_{10} u.f.c./ml LBA. Paralelamente, se extrajeron los dos pulmones: el izquierdo fue procesado para recuento de bacterias viables (para más detalle, véase **sección 1.3.10**); el derecho se fijó en su posición anatómica junto con la porción anterior del cuerpo (cabeza y cuello con vías aéreas superiores, laringe y tráquea) en formalina tamponada neutra 10%. Ratones no infectados que recibieron PBS o TxS, se usaron como controles. Para recuento de células en LBA, el volumen restante de cada muestra de LBA fue centrifugado (5.000 r.p.m., 3 min, 4°C). El *pellet* fue resuspendido en 1 ml RPMI 1640 con STF 10% y Hepes 10 mM, y se realizó recuento celular total con un hemocitómetro. Para la preparación de *cytospin* (1.500 r.p.m., 10 min, TA) (Thermo Shandon Cytospin) se usaron $\sim 5 \times 10^4$ células en 200 μ l RPMI 1640 con STF 10% y Hepes 10 mM. Se realizaron tinciones Giemsa con una unidad de preparación de portaobjetos de hematología automatizada (SP-10, Sysmex Cosporation). Las preparaciones se examinaron a doble ciego con un microscopio óptico (BX, Olympus).

2.3.15. Análisis histopatológico

Las cabezas y cuellos de los animales sacrificados se enjuagaron con agua durante 1 h, se sumergieron en ácido nítrico 5% durante 24-36 h hasta su descalcificación completa, y se realizaron 7-8 secciones transaxiales cada 3-4 mm, comenzando en las fosas nasales y terminando en la tráquea caudal. Las secciones transaxiales y los pulmones se incluyeron en parafina. Las secciones de 4-6 μ m se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se examinaron mediante microscopía para determinar el alcance de las lesiones inflamatorias. Las secciones fueron examinadas a ciegas por un patólogo veterinario entrenado (Dra. M. Barberán). Se analizaron parámetros que caracterizan reacciones inflamatorias agudas en vías aéreas superiores, laringe, tráquea y pulmón: hemorragias, hiperemia, infiltrados de células PMN, macrófagos alveolares. Los parámetros analizados fueron calificados subjetivamente en una escala de 0-3 (0: ausente; 1: leve; 2: moderado; 3:

severo). Como control de tejido, se procesaron los mismos órganos de animales no infectados, tratados con solución vehículo o TxS.

2.3.16. Análisis estadístico

Para auto-agregación, expresión génica, diámetro de zonas de crecimiento o inhibición, ChoP, deposición del complemento, infección celular, carga bacteriana en pulmón y LBA, y células inflamatorias en muestras LBA, se calculó la media \pm DE, y se realizó una comparación estadística usando *t-test* de dos colas. Para el análisis histopatológico, se calcularon las medias \pm DE y se realizaron comparaciones estadísticas con ANOVA seguido de comparación múltiple diferenciada protegida de Fisher (PLSD). En todos los casos, un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron con el programa Prism versión 7, paquete estadístico para Mac (GraphPad Software), y se detallan en cada pie de figura.

2.4. Resultados

2.4.1. Aislamiento de una cepa HiNT dependiente de timidina de una muestra de esputo de un paciente EPOC tratado con TxS

De las 2.542 cepas de HiNT aisladas de muestras respiratorias entre 2010 y 2014 en el HUB, 119 (4.7%) formaron colonias de crecimiento lento en MH-F agar. Se realizó un escrutinio de auxotrofia a timidina en estas 119 cepas mediante análisis comparado de crecimiento en agar chocolate y MH-F agar. La dependencia de timidina se confirmó por ausencia de crecimiento en MH-F agar y restauración de crecimiento en este medio en presencia de discos de papel impregnados con timidina. Se identificó una cepa HiNT auxótrofa a timidina, denominada HiNT8233, aislada de una muestra de esputo de un paciente EPOC que había recibido TxS durante 36 días como tratamiento frente a una exacerbación aguda por *Stenotrophomonas maltophilia*. HiNT8233 produjo colonias pequeñas en agar chocolate y no creció en MH-F agar, excepto alrededor de discos impregnados en timidina (300 $\mu\text{g/ml}$ o 10 mg/ml), siendo el crecimiento dependiente de la concentración de timidina (**Figura 23**).

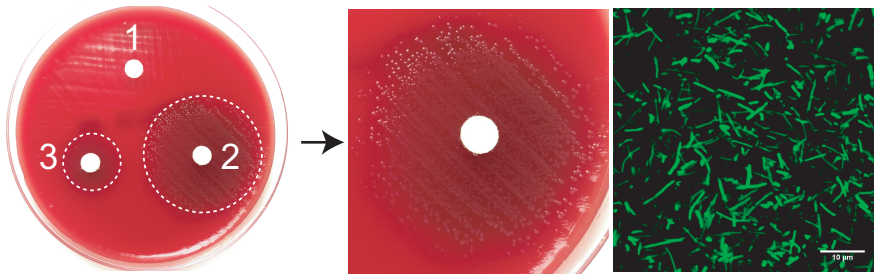


Figura 23. Caracterización de un aislado clínico auxótrofo a timidina, HiNT8233. Crecimiento de HiNT8233 en MH-F agar alrededor de discos impregnados en agua (1), timidina 10 mg/ml (2), timidina 300 µg/ml (3). Los círculos punteados delimitan el halo de crecimiento (izquierda). Detalle del crecimiento bacteriano alrededor del disco de timidina 10 mg/ml (medio). La morfología de HiNT8233 se observó mediante tinción SYTO 9 y microscopía confocal (barra de escala, 10 µm) (derecha).

Se secuenció el gen *thyA* de HiNT8233 y se identificó una inserción de 6 nucleótidos 267GAAAAT que provoca la incorporación de dos aminoácidos (E90N91), en comparación a la secuencia de *thyA* en la cepa de referencia RdKW20 (Fleischmann et al., 1995). La predicción estructural de ThyA de *H. influenzae*, basada en la proteína ThyA de *Burkholderia thailandensis* (PDB: 3V8H), fue generada mediante una herramienta de modelado automatizado del servidor Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org>). ThyA_{HiNT8233} mostró 11 hélices α , 6 láminas β y varias regiones de conexión entre ellos (**Figura 24A**). La homología entre la predicción estructural de ThyA_{HiNT8233} y ThyA_{RdKW20} se muestra en la **Figura 24D**. Por otra parte, HiNT8233 mostró una morfología de filamentos no septados, ~5-10 veces más grandes que el promedio de HiNT, tras análisis mediante microscopía confocal (**Figura 23, panel derecho**).

La ausencia de crecimiento de HiNT8233 en MH-F agar no permitió evaluar su susceptibilidad antibiótica mediante procedimientos estándar (www.eucast.org/clinical_breakpoints). Por ello, se analizó la resistencia a TxS mediante E-test utilizando un césped bacteriano crecido en agar chocolate, lo que mostró una CMI de >32 µg/ml. La auxotrofia a timidina de HiNT8233 resultó ser reversible, como se ha descrito en otros patógenos (Kahl, 2014). Tras la reversión, HiNT8233 no presentó morfología filamentosa (datos no mostrados), y la secuencia de *thyA* no presentó la inserción de 6 nucleótidos descrita anteriormente, si bien la CMI de TxS se mantuvo sin cambios.

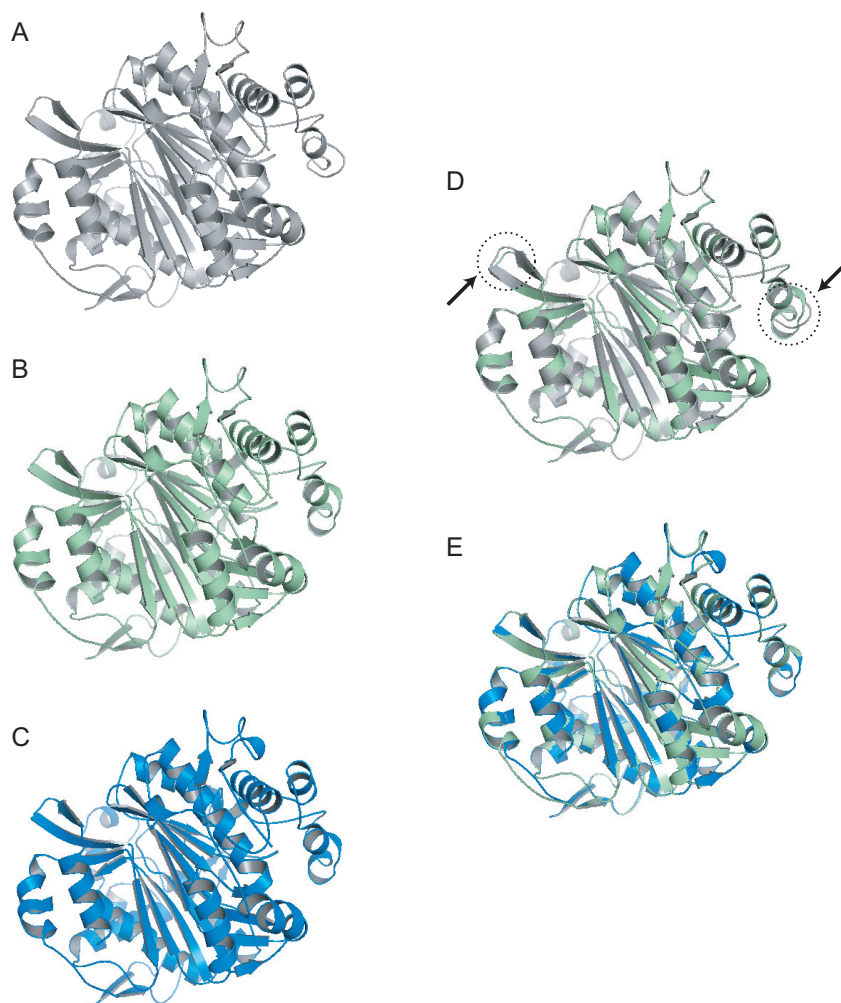


Figura 24. Predicción estructural de las proteínas ThyA_{HiNT8233} (A), ThyA_{RdKW20} (B) y ThyA_{HiNT375} (C), mediante modelado automatizado del servidor Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org>). El alineamiento estructural entre parejas de proteínas y su representación se generó con el *software* de visualización Open PyMOL (<http://www.pymol.org>). Se muestran las superposiciones de ThyA_{HiNT8233} y ThyA_{RdKW20} (D), y de ThyA_{RdKW20} y ThyA_{HiNT375} (E). Los cambios estructurales entre ThyA_{HiNT8233} y ThyA_{RdKW20} están indicados con un círculo y una flecha. La flecha derecha indica los aminoácidos E90 y N91 en ThyA_{HiNT8233} (ausentes en ThyA_{RdKW20}).

La identificación de HiNT8233 sugiere que la auxotrofia a timidina puede ser una respuesta al tratamiento con TxS en HiNT. Esta respuesta a la presión antibiótica podría estar subestimada clínicamente por la falta de crecimiento

bacteriano en MH-F agar, como ha sido descrito previamente (Platt et al., 1983). A continuación, generamos mutantes en el gen *thyA* en dos cepas HiNT previamente caracterizadas, para el estudio del impacto de la auxotrofia a timidina en la fisiología y patogénesis de HiNT.

2.4.2. Generación y caracterización de cepas *H. influenzae* auxótrofas a timidina

Se emplearon las cepas de *H. influenzae* HiNT375 y RdKW20, cuyos genomas han sido secuenciados previamente, para generar mutantes dependientes de timidina exógena mediante la disrupción del gen *thyA* (NF38_0045 y HI0905, respectivamente). Las proteínas ThyA_{HiNT375} y ThyA_{RdKW20} mostraron 98.2% de identidad (**Figura 24E**). Los mutantes se seleccionaron en sBHI agar generando colonias de tamaño WT (datos no mostrados). A diferencia de las cepas WT, los mutantes no crecieron en MH-F agar, pero sí en MH-F agar alrededor de discos de papel impregnados con timidina. El crecimiento bacteriano fue dependiente de la concentración de timidina presente en los discos (**Figura 25A, Tabla 4**) con mayor crecimiento alrededor de discos con timidina 10 mg/ml que con timidina 300 µg/ml (HiNT375 Δ *thyA*, $p < 0.005$; RdKW20 Δ *thyA*, $p < 0.05$). HiNT375 WT y Δ *thyA* presentaron CMIs de TxS=0.25 y 0.38-0.5 µg/ml, respectivamente; RdKW20 WT y Δ *thyA*, presentaron CMIs de TxS=0.12 y 0.5-0.75 µg/ml, respectivamente. Se observaron halos de inhibición del crecimiento alrededor de discos de TxS de mayor diámetro en el caso de las

Tabla 4. Crecimiento bacteriano en diferentes medios y condiciones.

Cepa <i>H. influenzae</i>	Agar chocolate	MH-F agar	Diámetro de crecimiento en MH-F agar alrededor de discos de Thy ¹ (cm)	
			Thy 300 µg/ml	Thy 10 mg/ml
HiNT375	sí ²	sí	sí	sí
HiNT375 Δ <i>thyA</i>	sí	no ³	0.65±0.05	1.83±0.025
HiNT375 Δ <i>thyA</i> +Thy ⁴	sí	no	1.25±0.05	2.9±0.1
RdKW20	sí	sí	sí	sí
RdKW20 Δ <i>thyA</i>	sí	no	0.9±0.1	1.83±0.08
RdKW20 Δ <i>thyA</i> +Thy	sí	no	1.4±0.1	3.35±0.05

¹Thy, timidina.

²Crecimiento bacteriano formando un césped.

³Ausencia total de crecimiento.

⁴HiNT375 Δ *thyA*+Thy, bacterias previamente crecidas en chocolate+Thy fueron usadas para inocular placas de agar chocolate o MH-F agar.

cepas WT que en $\Delta thyA$ (**Figura 25A**). La morfología de HiNT375 $\Delta thyA$ y RdKW20 $\Delta thyA$ fue analizada mediante microscopía confocal, mostrando filamentos no septados. La longitud bacteriana media, medida mediante TEM en ~ 70 bacterias por cepa, fue: (i) 1.42 ± 0.56 y 3.78 ± 2.86 μm para HiNT375 WT y $\Delta thyA$, respectivamente ($p < 0.0001$); (ii) 1.43 ± 0.24 y 4.6 ± 4.98 μm para RdKW20 WT y $\Delta thyA$, respectivamente ($p < 0.0001$).

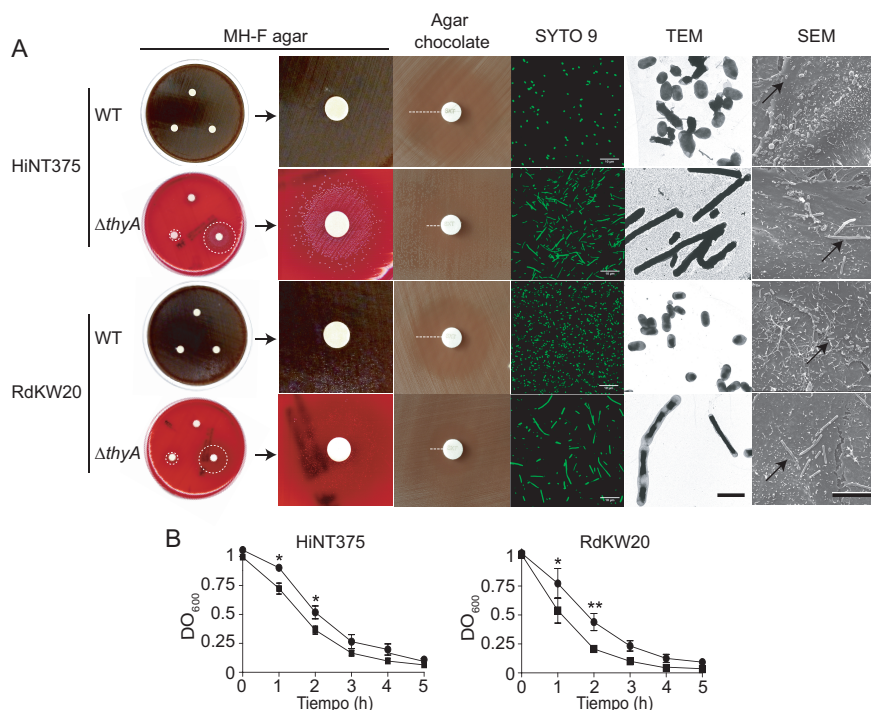


Figura 25. La auxotrofia a timidina modifica el crecimiento y la morfología de *H. influenzae*. (A) Crecimiento de las cepas HiNT375, RdKW20 WT y $\Delta thyA$ en MH-F agar donde se dispusieron discos estériles impregnados en agua (superior), timidina 10 mg/ml (derecha), timidina 300 $\mu\text{g/ml}$ (izquierda). Los círculos punteados indican la zona de crecimiento alrededor de los discos de timidina; se muestra detalle del crecimiento bacteriano alrededor del disco de timidina 10 mg/ml. Halos de inhibición del crecimiento de las cepas HiNT375 y RdKW20, WT y $\Delta thyA$, en agar chocolate alrededor de discos de TxS; las líneas punteadas indican la zona de inhibición del crecimiento. La morfología bacteriana se observó mediante tinción SYTO 9 y microscopía confocal (barra de escala, 10 μm), TEM (barra de escala, 2 μm , ampliación 25.000x) y SEM (barra de escala, 10 μm , ampliación 6.000x). En los paneles SEM, las flechas negras indican bacterias infectando epitelio respiratorio en cultivo. (B) Efecto de la auxotrofia a timidina en la autoagregación de *H. influenzae*. Izquierda, cepas HiNT375 WT y $\Delta thyA$; derecha, cepas RdKW20 WT y $\Delta thyA$. Símbolos: cepas WT, círculo negro; mutantes $\Delta thyA$, cuadrado negro. La autoagregación mostrada por los mutantes *thyA* es mayor que la de sus respectivas cepas WT (HiNT375, $p < 0.05$ a 1 y 2 h; RdKW20, $p < 0.05$ a 1 h, y $p < 0.0005$ a 2 h). Las diferencias significativas se indican con *.

El análisis SEM mostró bacterias $\Delta thyA$ de gran tamaño en la superficie de células A549, en comparación con la cepa WT, lo que podría modificar la dinámica del proceso infeccioso (**Figura 25A**).

La formación de autoagregados bacterianos puede promover la formación de microcolonias de HiNT en la superficie de células humanas (Mell et al., 2016; Meng et al., 2011). Para evaluar si el aumento de tamaño asociado a la auxotrofia a timidina produce cambios en la capacidad autoagregativa de este patógeno, se monitorizó la DO_{600} de suspensiones bacterianas estáticas, mostrando que los mutantes $\Delta thyA$ tienen mayor capacidad autoagregativa que sus respectivas cepas WT (**Figura 25B**).

En conjunto, la inactivación del gen *thyA* en HiNT genera: (i) incapacidad para crecer en MH-F agar, lo que puede ser parcialmente restaurado por la presencia de timidina exógena en el medio; (ii) bacilos alargados con mayor capacidad auto-agregativa que las cepas WT isogénicas; (iii) aumento de la resistencia a TxS.

2.4.3. La dependencia de timidina causa defectos de crecimiento en *H. influenzae*

A continuación, se analizó el crecimiento de HiNT375 (WT y $\Delta thyA$) y RdKW20 (WT y $\Delta thyA$) en sBHI. HiNT375 $\Delta thyA$ mostró una fase de latencia extendida y DO_{600} final inferior a HiNT375 WT, lo que se relacionó con una reducción de su viabilidad, mediante cuantificación u.f.c./ml (**Figura 26A**). RdKW20 $\Delta thyA$ también mostró una fase de latencia ligeramente prolongada y un número menor de bacterias viables que los obtenidos para la cepa WT (**Figura 26B**). Los defectos de crecimiento se restauraron parcialmente mediante la adición de timidina 300 $\mu\text{g/ml}$ en el medio sBHI, en el precultivo o en el medio sBHI utilizado para monitorizar el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo (**Figuras 26A y 26B**). Mediante microscopía de inmunofluorescencia, observamos bacterias alargadas al final de la curva de crecimiento de HiNT375 $\Delta thyA$ en sBHI. El análisis morfológico tras el precrecimiento de

HiNT375 Δ *thyA* en sBHI con timidina 300 μ g/ml mostró una población mixta, con bacterias largas y bacterias de tamaño comparable a la cepa WT (**Figura 26A, derecha**). Esta observación puede estar relacionada con la restauración de DO₆₀₀ observada, pero no con los recuentos de HiNT375 Δ *thyA* tras su precultivo en sBHI con timidina.

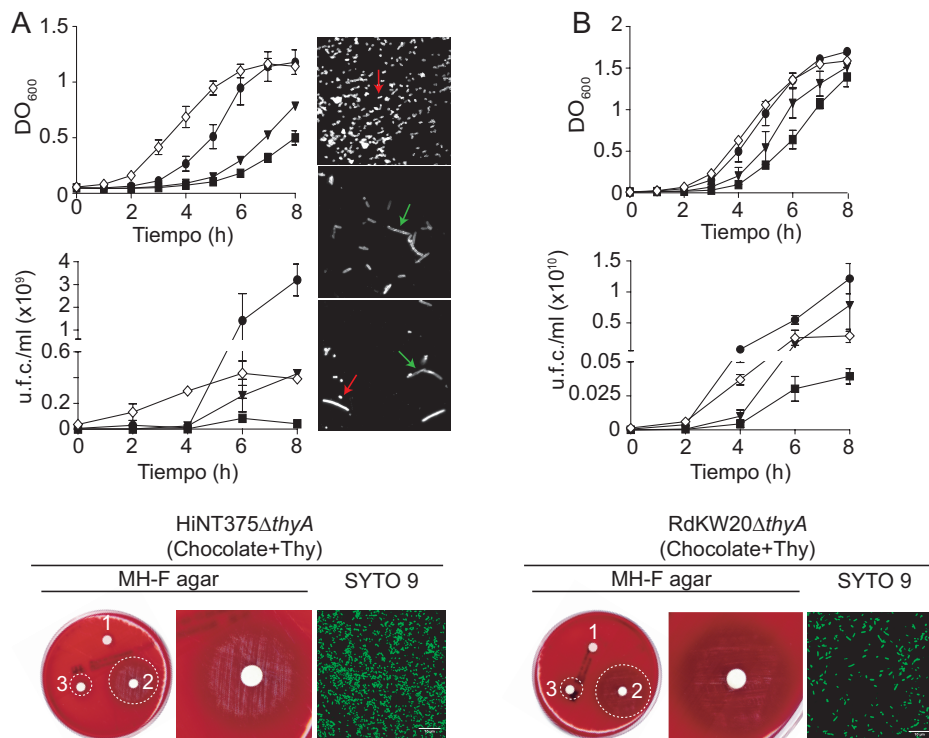


Figura 26. El crecimiento de *H. influenzae* es modificado por la disponibilidad de timidina. (A) Crecimiento bacteriano, en ausencia o presencia de timidina, de cepas HiNT375 (A) y RdKW20 (B), WT y Δ *thyA*. El crecimiento en sBHI se muestra como DO₆₀₀ (panel superior) y u.f.c./ml (panel central), a los tiempos indicados. Las cepas WT se crecieron en sBHI (círculo negro); las cepas Δ *thyA* fueron crecidas en (i) sBHI (cuadrado negro), (ii) sBHI + timidina 300 μ g/ml (triángulo negro invertido), (iii) sBHI + timidina 300 μ g/ml (precultivo), y crecimiento posterior en sBHI (diamante blanco). (A, B) paneles inferiores: crecimiento en MH-F agar de cepas Δ *thyA* precrecidas en agar chocolate con timidina 300 μ g/ml (chocolate+Thy), alrededor de discos de papel estéril impregnados en agua (1), timidina 10 mg/ml (2), timidina 300 μ g/ml (3). Los círculos punteados indican la zona de crecimiento alrededor de los discos. La morfología bacteriana se muestra mediante tinción SYTO 9 y microscopía confocal (barra de escala, 10 μ m). Panel central: se muestra microscopía de inmunofluorescencia en el punto final de la curva de crecimiento, HiNT375 WT, Δ *thyA* y Δ *thyA* precrecido en sBHI + timidina 300 μ g/ml, imágenes superior, media e inferior en A, respectivamente. Flechas rojas, tamaño medio de HiNT WT; flechas verdes, bacterias formando filamentos.

Por otra parte, HiNT375 Δ *thyA* y RdKW20 Δ *thyA*, precrecidos en agar chocolate con timidina (chocolate+Thy), crecieron en MH-F agar alrededor de discos de timidina con una zona de crecimiento de mayor diámetro alrededor de discos con timidina 10 mg/ml que con timidina 300 μ g/ml (HiNT375 Δ *thyA*, $p < 0.005$; RdKW20 Δ *thyA*, $p < 0.005$). Los mutantes Δ *thyA* precrecidos en estas condiciones (chocolate+Thy) presentaron mejor crecimiento en MH-F agar alrededor de discos con timidina que al ser precrecidos en agar chocolate (timidina 300 μ g/ml, HiNT375 Δ *thyA*, $p < 0.05$; timidina 10 mg/ml, HiNT375 Δ *thyA*, $p < 0.05$, RdKW20 Δ *thyA*, $p < 0.005$) (**Figuras 25A, 26A y 26B, panel inferior; Tabla 4**). Asimismo, el crecimiento en chocolate+Thy restaura la longitud y morfología de los mutantes Δ *thyA*, siendo comparables a sus respectivas cepas WT (**Figuras 25A, 26A y 26B, panel inferior**).

2.4.4. La auxotrofia a timidina modifica la expresión del transportador de nucleósidos codificado el gen *nupC* en *H. influenzae*

El crecimiento de HiNT375 Δ *thyA* y RdKW20 Δ *thyA* en MH-F agar alrededor de discos con timidina, y la restauración de la morfología y crecimiento bacteriano en presencia de timidina exógena, planteó la hipótesis de que estos mutantes pudieran adquirir timidina del medio para superar su auxotrofia. Es conocido que en *S. aureus*, el gen *nupC*, que codifica un transportador de nucleósidos, está sobreexpresado en *Small Colony Variants* (SCVs) dependientes de timidina, y que la inactivación del gen *nupC* impide el uso de timidina exógena para crecer en presencia de TxS (Chatterjee et al., 2008; Kriegeskorte et al., 2014). Los genes HI0519 y NF38_02480 están anotados como *nupC* en los genomas RdKW20 y HiNT375, respectivamente (Fleischmann et al., 1995; Mell et al., 2014). Evaluamos la expresión de *nupC* en *H. influenzae* mediante qRT-PCR, mostrando mayor expresión (diferencias no significativas) en los mutantes Δ *thyA* que en sus respectivas cepas WT crecidas en sBHI (**Figura 27A**). Dado que la adición de timidina en sBHI restauró parcialmente los defectos de crecimiento de los mutantes Δ *thyA*, se analizó la expresión de *nupC* en bacterias Δ *thyA* precultivadas en sBHI+timidina y posteriormente crecidas en sBHI (Δ *thyA*+Thy_{o/n}), o en bacterias Δ *thyA* crecidas en sBHI+timidina (Δ *thyA*+Thy),

siendo la expresión de *nupC* mayor en la primera de estas dos condiciones (**Figura 27A**). Asimismo, el crecimiento previo de los mutantes $\Delta thyA$ en agar chocolate+Thy produjo una ausencia total de inhibición de crecimiento alrededor de discos de TxS en agar chocolate (datos no mostrados).

A continuación, se generaron las cepas HiNT375 $\Delta nupC$ y RdKW20 $\Delta nupC$, que mostraron tasas de crecimiento comparables a las de sus respectivas cepas WT en sBHI, sBHI agar, agar chocolate y MH-F agar (**Figura 27B** y datos no mostrados). Para evaluar la función de *nupC* como transportador de pirimidina responsable de la captación de timidina exógena por *H. influenzae*, analizamos la capacidad de HiNT375 $\Delta nupC$ y RdKW20 $\Delta nupC$ para usar dicha timidina y crecer en presencia de TxS en un ensayo disco-difusión. Sin embargo, las zonas de inhibición de crecimiento en agar chocolate y MH-F agar fueron comparables entre las cepas WT y $\Delta nupC$. Asimismo, la inhibición del crecimiento alrededor de discos TxS se analizó en agar chocolate y MH-F agar suplementados con timidina. No se observaron diferencias concluyentes porque el crecimiento

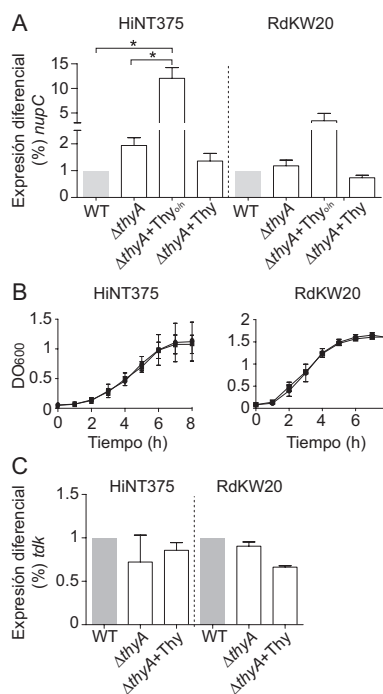


Figura 27. La inactivación de *thyA* en *H. influenzae* modula la expresión del gen *nupC*, que codifica un putativo transportador de nucleósidos; pero no de la timidina quinasa TdK. (A) La inactivación de *thyA* en *H. influenzae* modula la expresión del gen *nupC*, que codifica un putativo transportador de nucleósidos. Se muestra la expresión del gen *nupC* en las cepas HiNT375 y RdKW20, WT y mutantes *thyA*. Las cepas WT se crecieron en sBHI; las cepas $\Delta thyA$ se crecieron en sBHI ($\Delta thyA$), sBHI + timidina 300 $\mu\text{g/ml}$ ($\Delta thyA + Thy$), o bien se precultivaron en sBHI + timidina 300 $\mu\text{g/ml}$ y se crecieron en sBHI + timidina 300 $\mu\text{g/ml}$ ($\Delta thyA + Thy_{o/n}$). La expresión de *nupC* fue mayor en los mutantes *thyA* precultivados en sBHI + timidina ($\Delta thyA + Thy_{o/n}$) que en los mutantes *thyA* crecidos en sBHI ($\Delta thyA$) (HiNT375, $p < 0.05$). (B) La inactivación de *nupC* no modifica el crecimiento de HiNT en sBHI. (C) La auxotrofia a timidina de *H. influenzae* no modula la expresión de la timidina quinasa TdK. Se muestra la expresión del gen *tdk* tras crecimiento bacteriano en sBHI, en ausencia o presencia de timidina, en las cepas WT y $\Delta thyA$. Las cepas WT se crecieron en sBHI; las cepas $\Delta thyA$ se crecieron en sBHI ($\Delta thyA$), o sBHI + timidina 300 $\mu\text{g/ml}$ ($\Delta thyA + Thy$).

bacteriano en placas con alta concentración de timidina puede producir zonas de crecimiento difuso. La búsqueda de transportadores de pirimidina en todas las cepas de *H. influenzae* con genoma disponible no reveló putativos transportadores adicionales a NupC. Asimismo, no fue posible generar un doble mutante $\Delta thyA\Delta nupC$, lo que en conjunto puede sugerir un posible papel de NupC en la captación de timidina externa.

El timidilato es sintetizado por la timidilato sintetasa ThyA y por la timidina quinasa TK. En *Mycoplasma pneumoniae*, la inactivación de la primera resulta en la sobreexpresión de la segunda (Wang et al., 2010). HI0529 y NF38_02430 están anotados como timidina quinasa *tdk* en los genomas RdKW20 y HiNT375, respectivamente (Fleischmann et al., 1995; Mell et al., 2014). A diferencia de *nupC*, la expresión de *tdk* fue similar en las cepas WT y $\Delta thyA$ crecidas en sBHI, independientemente de la adición de timidina (**Figura 27C**).

En conjunto, estos resultados sugieren que *nupC* puede ser un transportador de timidina exógena en *H. influenzae*, cuya expresión puede contrarrestar los efectos del TxS en la biosíntesis de timidina *de novo*.

2.4.5. La auxotrofia a timidina reduce la expresión de ChoP y la deposición de C3b en *H. influenzae*

En un trabajo previo del grupo de investigación, se observó que bacterias que carecen de ChoP autoagregan más rápido (Morey et al., 2013). Los mutantes $\Delta thyA$ mostraron una autoagregación más rápida que la de sus respectivas cepas WT (**Figura 25B**), que podría estar relacionado con cambios en morfología celular (elongación) o en la cantidad de residuos ChoP en la superficie bacteriana. La cantidad de ChoP en HiNT375 y RdKW20, WT y $\Delta thyA$ crecidas en sBHI fue cuantificada mediante citometría de flujo. La auxotrofia a timidina disminuyó la cantidad de ChoP en los mutantes HiNT375 $\Delta thyA$ y RdKW20 $\Delta thyA$, que se restableció en HiNT375 $\Delta thyA$ tras crecimiento en sBHI+timidina. La detección de ChoP fue mayor en los mutantes $\Delta thyA$ crecidos en sBHI+timidina que en las cepas WT (**Figura 28A**). La disminución de los niveles de ChoP en los mutantes

ΔthyA no modificó su capacidad para unir CRP (Weiser et al., 1998) (**Figura 28B**). Para evaluar el efecto de la morfología celular en la interacción de elementos del sistema de complemento con la superficie bacteriana, se analizó la deposición de C3b. Se detectó menor depósito de C3b en HiNT375*ΔthyA* que en HiNT375 WT, que fue restaurado mediante crecimiento en sBHI+timidina (**Figura 28C, panel izquierdo**). No se observaron diferencias en la deposición de C3b entre las cepas RdKW20 WT y *ΔthyA* (**Figura 28C, panel derecho**).

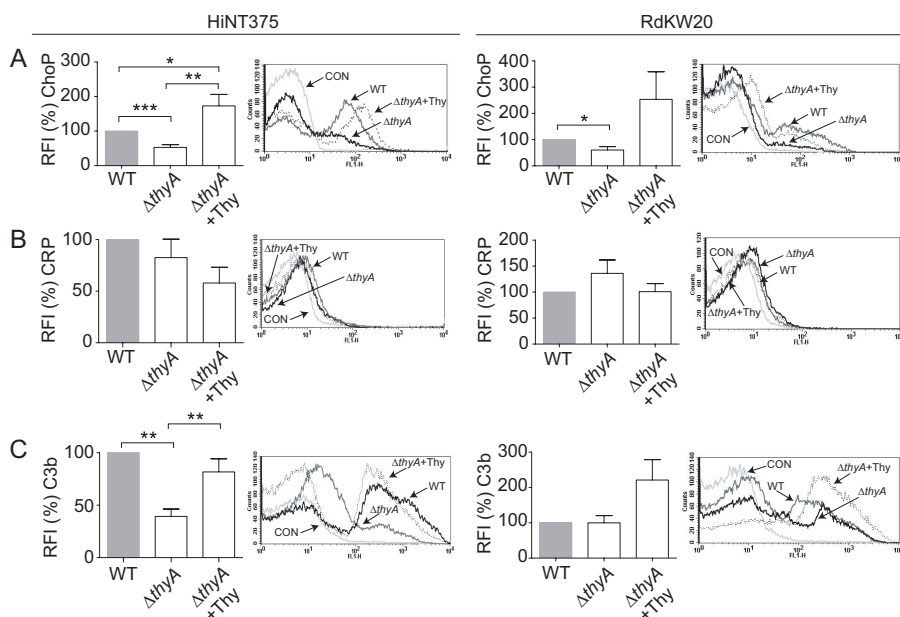


Figura 28. La auxotrofia a timidina reduce el nivel de ChoP en HiNT375 y RdKW20, y la unión de C3b en HiNT375. (A) Las cepas HiNT WT y *ΔthyA* fueron crecidas en fase exponencial en sBHI, en ausencia/presencia de timidina 300 μg/ml, e incubadas con un Ac anti-ChoP; **(B)** suero humano y Ac anti-CRP; **(C)** suero humano y Ac anti-C3b. La unión antígeno-anticuerpo se analizó mediante citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de la citometría de flujo (derecha). Código de colores: gris claro, tampón control (CON); gris, cepas WT; negro, cepas *ΔthyA*; línea punteada, *ΔthyA* crecida en sBHI+Thy. HiNT375*ΔthyA* ($p < 0.0001$) y RdKW20*ΔthyA* ($p < 0.05$) presentan menor nivel de ChoP, y HiNT375*ΔthyA* menor unión de C3b ($p < 0.01$) que la cepa WT. Restablecimiento fenotípico tras crecimiento de *ΔthyA* en sBHI + timidina 300 μg/ml (HiNT375*ΔthyA*: ChoP, $p < 0.01$; C3b, $p < 0.01$). La detección de ChoP fue mayor en el caso de la cepa HiNT375*ΔthyA* crecida en sBHI + timidina que en el de la cepa HiNT375 ($p < 0.05$). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$).

En resumen, la inactivación del gen *thyA* provocó una reducción de la

cantidad de ChoP en la superficie de *H. influenzae*. Esta observación puede asociarse con la menor deposición de C3b observada en HiNT375 Δ *thyA* respecto a HiNT375 WT, sugiriendo que la auxotrofia a timidina puede afectar el reconocimiento bacteriano por C3b mediante un mecanismo independiente de CRP.

2.4.6. La dependencia de timidina modifica la interacción de *H. influenzae* con el epitelio respiratorio humano

Para evaluar si los cambios en la morfología bacteriana causados por la inactivación de *thyA* alteran la interacción de HiNT con el epitelio respiratorio, comparamos la capacidad infectiva de cepas WT y Δ *thyA* en células A549.

La adhesión e invasión de células A549 por HiNT375 Δ *thyA* fue menor que la de la cepa WT (**Figura 29A**). Para analizar si la timidina exógena restaura esta deficiencia, se realizaron infecciones con bacterias crecidas en sBHI, en ausencia o presencia de timidina (sBHI \pm Thy). La adhesión epitelial de HiNT375 Δ *thyA* crecida en sBHI fue menor que la de la cepa WT, y se restauró por adición de timidina (**Figura 29A, panel derecho**). Los mismos resultados se observaron al analizar la adhesión de la cepa RdKW20 Δ *thyA* (**Figura 30A**). Dada la escasa infección epitelial asociada a la inactivación de *thyA*, analizamos la respuesta inflamatoria asociada. La cantidad de IL-8 secretada por células A549 fue mayor tras la infección por HiNT375 Δ *thyA* que por HiNT375 WT, y se equiparó a los niveles de la cepa WT tras la infección por HiNT375 Δ *thyA* crecida en agar chocolate+Thy (**Figura 29C**). HiNT375 Δ *thyA* también presentó menor tasa de infección de epitelio bronquial humano NCI H-292 (Euba et al., 2015c) (**Figura 29B**).

Esta deficiencia fue restaurada mediante crecimiento de HiNT375 Δ *thyA* en sBHI con timidina. Además, la adhesión epitelial de HiNT375 Δ *thyA* tras crecimiento en sBHI+Thy fue mayor que la de la cepa WT (**Figura 29B, panel derecho**).

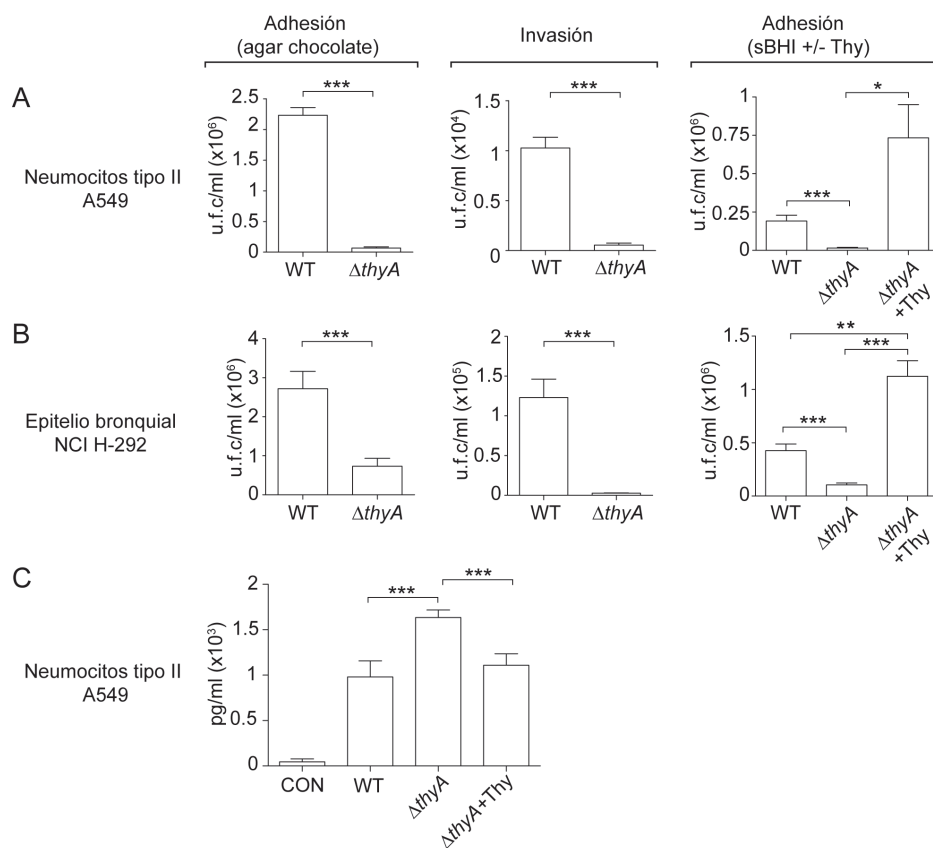


Figura 29. La inactivación del gen *thyA* modula la interacción de *H. influenzae* con el epitelio respiratorio.

Para cuantificar la tasa de infección respiratoria de HiNT375 WT y $\Delta thyA$, se emplearon neumocitos tipo II A549 (A) y células epiteliales bronquiales NCI H-292 (B). Adhesión: los inóculos fueron preparados usando bacterias precrecidas en agar chocolate según (Morey et al., 2011) (izquierda). Alternativamente, se usaron bacterias precrecidas en sBHI, en ausencia o presencia de timidina (sBHI +/- Thy) (derecha). HiNT375 $\Delta thyA$ mostró menor adhesión a células A549 (agar chocolate, $p < 0.005$; sBHI, $p < 0.005$) y NCI H-292 (agar chocolate, $p < 0.005$; sBHI, $p < 0.005$) que la cepa WT. Esta deficiencia fue restaurada mediante precrecimiento en sBHI + timidina 300 $\mu\text{g/ml}$ (A549, $p < 0.05$; NCI H-292, $p < 0.005$). HiNT375 $\Delta thyA$ mostró una entrada menor en células A549 ($p < 0.005$) y NCI H-292 ($p < 0.005$) que la cepa WT. (C) La secreción de IL-8 fue mayor en células infectadas con HiNT375 $\Delta thyA$ que con la cepa WT ($p < 0.005$). Este aumento es restaurado tras infección con HiNT375 $\Delta thyA$ crecida en agar chocolate + Thy ($p < 0.005$) ($*p < 0.05$, $**p < 0.005$, $***p < 0.005$).

La opsonización por C3 mejora la interacción bacteria-epitelio en el caso de cepas no capsuladas de *K. pneumoniae* (de Astorza et al., 2014). En base a la deposición diferencial de C3b observada entre HiNT375 WT y $\Delta thyA$, analizamos el efecto de C3 en la infección de células A549 por HiNT. HiNT375 WT y

HiNT375 Δ *thyA* fueron crecidas en agar chocolate (Δ *thyA*) o chocolate+Thy (Δ *thyA*+Thy), y las células A549 se infectaron en presencia de suero deficiente en C3, C3 purificado, o suero deficiente en C3 reconstituido con C3 humano purificado. Sin embargo, la presencia de C3 no modificó la tasa de adhesión bacteriana (**Figura 30**).

Por tanto, la auxotrofia a timidina modificó la capacidad de HiNT para infectar epitelio respiratorio humano. Los efectos de la inactivación de *thyA* fueron compensados mediante la adición de timidina al medio de cultivo. La presencia de C3 no moduló la adhesión bacteriana.

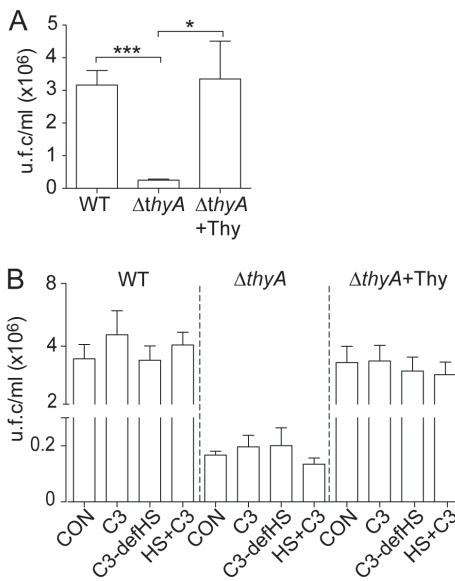


Figura 30. La presencia de C3 no afecta la infección epitelial por *H. influenzae*. (A) La inactivación del gen *thyA* reduce la adhesión epitelial de *H. influenzae* RdKW20. Se utilizaron bacterias precrecidas en sBHI, en ausencia o presencia de timidina 300 μ g/ml. RdKW20 Δ *thyA* mostró menor adhesión ($p < 0.0001$) que la cepa WT, lo que fue restaurado tras precrecimiento del mutante en sBHI + timidina ($p < 0.05$). (B) HiNT375 WT y Δ *thyA* fueron crecidas en agar chocolate (Δ *thyA*) o agar chocolate + Thy (Δ *thyA*+Thy). Las células A549 fueron infectadas en presencia de C3 purificado (C3), suero humano deplecionado de C3 (C3-def HS), o suero humano deplecionado de C3 y reconstituido con C3 humano purificado (HS+C3). La adhesión bacteriana no mostró cambios.

2.4.7. La inactivación del gen *thyA* atenúa la virulencia de *H. influenzae* y confiere ventaja al patógeno durante el tratamiento antibiótico con TxS *in vivo*

Finalmente, se determinó el impacto de la auxotrofia a timidina *in vivo* mediante un modelo de infección respiratoria murina por HiNT (Euba et al., 2015b; Euba et al., 2015c; Euba et al., 2017; Fernandez-Calvet et al., 2018;

Morey et al., 2013; Rodríguez-Arce et al., 2017). Los ratones se infectaron con HiNT375 WT y $\Delta thyA$, tras su crecimiento en agar chocolate. Se determinó la carga bacteriana en pulmón y LBA a 12, 24 y 48 hpi. En pulmón, los recuentos de HiNT375 $\Delta thyA$ fueron inferiores a los de la cepa WT a los tres tiempos analizados. En LBA, los recuentos de HiNT375 $\Delta thyA$ fueron inferiores a los de la cepa WT a 12 y 24 hpi (**Figura 31A y 31B**). A continuación, analizamos si la auxotrofia a timidina, que provoca atenuación, confiere una ventaja a *H. influenzae* durante un tratamiento con TxS. Para ello, administramos TxS 960 mg/kg (TMP:SMX 1:5) cada 6 h, comenzando a 6 hpi. El tratamiento con TxS fue más eficiente frente a la cepa WT que frente al mutante $\Delta thyA$, con una reducción significativa de la carga bacteriana en pulmón a 12, 24 y 48 hpi, y en LBA a 24 hpi, en animales tratados vs no tratados con TxS. La administración de TxS no modificó la carga de HiNT375 $\Delta thyA$ a 12 y 24 hpi en pulmón y LBA. El efecto protector de la inactivación de *thyA* frente a TxS no se observó a 48 hpi.

En base a las diferencias observadas a 24 hpi, propusimos restaurar la atenuación de HiNT375 $\Delta thyA$ mediante infección con bacterias precrecidas en agar chocolate+Thy, lo que no restableció los recuentos bacterianos en pulmón o LBA. Además, el crecimiento de HiNT375 $\Delta thyA$ en chocolate+Thy aumentó la eficacia del TxS, con recuentos bacterianos en pulmón y LBA de animales tratados con TxS mayores tras la infección por la cepa HiNT375 $\Delta thyA$ previamente crecida en agar chocolate que en chocolate+Thy. Por último, los recuentos de HiNT375 $\Delta thyA$ previamente crecido en chocolate+Thy en pulmón y LBA fueron mayores en animales no tratados que en animales tratados con TxS (**Figuras 31A y 31B**).

El análisis histopatológico de vías aéreas superiores, laringe, tráquea y pulmón de ratones infectados por HiNT375 WT o $\Delta thyA$ mostró lesiones inflamatorias (**Tabla 5**), al contrario que los pulmones y vías respiratorias de ratones control no infectados. En ratones infectados por HiNT375 WT o $\Delta thyA$, las vías respiratorias superiores mostraron infiltración de PMN en lámina propia y lumen. La infiltración de PMN fue mayor en el lumen de ratones infectados por HiNT375 $\Delta thyA$ que por bacterias WT, a 12 y 24 hpi. Por el contrario, la

infiltración de PMN de la lámina propia de la vía aérea superior fue mayor en ratones infectados por HiNT375 WT que por HiNT375 Δ thyA a 24 hpi. La aparición de infiltración leve en lámina propia y lumen con glóbulos rojos y PMN fueron los principales hallazgos en laringe y tráquea. Se observó un aumento no significativo del número de glóbulos rojos en los lúmenes de ratones infectados por HiNT375 WT en comparación con HiNT375 Δ thyA, más evidente a las 24 hpi. Como se ha descrito previamente (Euba et al., 2015b), los pulmones en ratones infectados mostraron áreas de bronconeumonía aguda donde los septos alveolares se engrosaron con edema y capilares septales hiperémicos.

En los espacios alveolares, se observaron neutrófilos, macrófagos alveolares y pequeñas hemorragias dispersas. La comparación de lesiones a 12 hpi mostró más hemorragias en las vías respiratorias inferiores de ratones infectados por HiNT375 WT que por HiNT375 Δ thyA (animales no tratados con TxS). Las hemorragias también se encontraron en mayor proporción en los alvéolos de ratones infectados con HiNT375 WT a las 12 que a 24 hpi, si bien con menor proporción de macrófagos alveolares en las vías respiratorias inferiores. No se encontraron diferencias significativas en los alvéolos de ratones infectados con HiNT375 Δ thyA respecto a la cepa WT. El análisis de lesiones de las vías respiratorias de ratones infectados por HiNT375 WT mostró diferencias entre ratones control y tratados con TxS, con mayor proporción de infiltración de PMN en los lúmenes de la vía aérea superior de ratones tratados con TxS a 24 hpi, y en los alvéolos de animales control no tratados a 12 hpi. Por el contrario, la infección por HiNT375 Δ thyA causó lesiones comparables en animales control y tratados con TxS (**Tabla 5**). La infección por HiNT375 Δ thyA precrecida en chocolate+Thy produjo lesiones inflamatorias similares en animales control y tratados con TxS, observando como única diferencia, mayor proporción de infiltración de PMN en los alvéolos de ratones tratados con TxS ($p < 0.05$).

La infección pulmonar por HiNT375 WT provocó mayor presencia de PMN y macrófagos alveolares en LBA en comparación con muestras procedentes de ratones infectados por HiNT375 Δ thyA. Asimismo, se observó menor acumulación de células inmunes en muestras de ratones tratados con TxS e

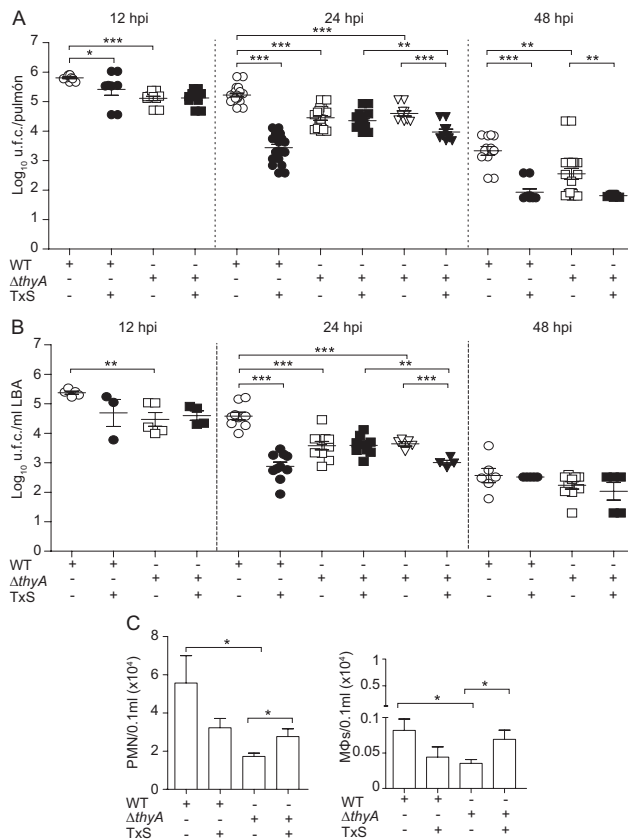


Figura 31. La inactivación de *thyA* atenúa la virulencia de *H. influenzae* y confiere ventaja durante el tratamiento con TxS *in vivo*. Ratones CD1 fueron infectados con HiNT375 WT (círculo) o Δ thyA (cuadrado). Cuando fue necesario, se aplicó un régimen terapéutico consistente en 960 mg/kg TxS (1:5 TMP:SMX) administrado por vía oral cada 6 h (símbolos negros). Los ratones fueron sacrificados a 12, 24, y 48 hpi. Las cargas bacterianas fueron cuantificadas en pulmón (\log_{10} u.f.c./pulmón) (**A**) y LBA (\log_{10} u.f.c./ml LBA) (**B**). La carga de HiNT375 Δ thyA fue menor en pulmón y LBA a 12 (pulmón, $p < 0.001$; LBA, $p < 0.01$), 24 (pulmón, $p < 0.001$; LBA, $p < 0.001$), y 48 (pulmón, $p < 0.01$) hpi que la de la cepa WT. La administración de TxS redujo significativamente los recuentos de la cepa WT en pulmones y muestras de LBA a 12 (pulmón, $p < 0.05$), 24 (pulmón, $p < 0.001$; LBA, $p < 0.001$), y 48 (pulmón, $p < 0.001$) hpi, en comparación a ratones infectados no tratados. Triángulos invertidos: los animales fueron infectados con la cepa HiNT375 Δ thyA precrecida en chocolate + Thy durante 16 h; cuando fue necesario, se administró TxS 960 mg/kg, por vía oral cada 6 h (triángulos negros invertidos). La carga de HiNT375 Δ thyA precrecida en chocolate + Thy fue menor en pulmón y LBA que la de la cepa WT ($p < 0.001$). HiNT375 Δ thyA precrecida en chocolate + Thy mostró menor carga en pulmón y LBA en ratones tratados con TxS que en animales no tratados ($p < 0.001$). En ratones tratados con TxS, la carga de HiNT375 Δ thyA precrecida en chocolate + Thy fue menor en pulmones y LBA que tras crecimiento en agar chocolate ($p < 0.01$). (**C**) Se analizaron PMN (izquierda) y macrófagos alveolares (MΦ, derecha) en muestras de LBA a 12 hpi. Se observaron recuentos de PMN y MΦs mayores en animales infectados por HiNT WT que en muestras procedentes de animales infectados con Δ thyA (PMN, $p < 0.05$; MΦs, $p < 0.05$). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

infectados por HiNT375 WT. Sin embargo, el tratamiento con TxS aumentó la acumulación celular, PMN y macrófagos alveolares, en muestras de LBA de ratones infectados por HiNT375 Δ *thyA* (**Figura 31C**).

En resumen, la auxotrofia a timidina reduce la virulencia de HiNT y, al mismo tiempo, confiere una ventaja durante el tratamiento con TxS *in vivo*, lo que sugiere que la captación de timidina procedente del tejido infectado podría contribuir a eludir el efecto bactericida del TxS. En general, se observaron rasgos inflamatorios más acusados en ratones infectados por HiNT375 WT que por HiNT375 Δ *thyA*.

Tabla 5. Evaluación de lesiones histopatológicas de vías aéreas de ratones tratados con solución vehículo (control) o con TxS, e infectados intranasalmente con las cepas HiNT375 WT o Δ l/hyA.

Cepa	Tratamiento ^a / hpi	Puntuación de lesiones histopatológicas (media \pm DE) ^b									
		Vías respiratorias altas			Laringe-tráquea			Pulmón			
		PMNs ^c lumen	PMNs lámina propia	Hiperemia	Globulos rojos en lumen	PMNs lámina propia	Hiperemia	Hemorragia	PMNs Bronquios-alveolos	Macrófagos alveolares	
HiNT375	Control / 12 h	^a 1,5 \pm 0,9	1,2 \pm 0,4	0,8 \pm 0,2	1,1 \pm 1,3	0,8 \pm 0,4	1,3 \pm 0,3	^g 0,7 \pm 0,3	^h 2 \pm 0,5	0,7 \pm 0,2	
	TxS / 12 h	1,1 \pm 0,6	1	1,1 \pm 0,4	0,5 \pm 1	0,7 \pm 0,3	1,5 \pm 0,7	0,3 \pm 0,5	ⁱ 1,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,4	
	Control / 24 h	^d 0,6 \pm 0,6	^f 1,1 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2	1,4 \pm 0,9	0,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,6	^k 0,2 \pm 0,2	^l 0,6 \pm 0,6	1,8 \pm 0,4	1,4 \pm 0,3
HiNT375 Δ hyA	TxS / 24 h	^e 2,1 \pm 1,9	1 \pm 0,5	1,1 \pm 0,5	1,7 \pm 1,2	0,4 \pm 0,2	1,7 \pm 0,4	0,6 \pm 0,6	1,8 \pm 0,5	1,7 \pm 0,2	
	Control / 12 h	^g 2,5 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	1,5 \pm 0,8	0,7 \pm 0,3	1,1 \pm 0,4	^h 0,3 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2	
	TxS / 12 h	2,1 \pm 0,4	0,9 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,8 \pm 1,1	0,8 \pm 0,4	0,9 \pm 0,4	ⁱ 0,1 \pm 0,2	1,7 \pm 0,5	0,8 \pm 0,4	
Control / 24 h	Control / 24 h	^j 1,7 \pm 1,1	0,6 \pm 0,2	1 \pm 0,3	0,5 \pm 0,8	0,7 \pm 0,2	1,6 \pm 0,4	0,2 \pm 0,2	2 \pm 0,3	1,1 \pm 0,4	
	TxS / 24 h	^k 1,8 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2	0,8 \pm 0,3	0,5 \pm 1	0,6 \pm 0,4	1 \pm 0,4	0,1 \pm 0,2	1,9 \pm 0,4	1,1 \pm 0,2	

^aControl, animales tratados con solución vehículo; TxS, una dosis de TxS fue administrada cada 6 h post-infección.

^bComparación estadística de la media de valores: ANOVA de una cola (Comparación múltiple de Fisher, PLSD).

^cPMNs, infiltrado de neutrófilos.

^dMayor reclutamiento de PMNs en lumen de vías aéreas altas en animales infectados con HiNT375 Δ hyA que con la cepa WT, a 12 y 24 hpi (p<0.05).

^eMayor reclutamiento de PMNs en lumen de vías aéreas altas de ratones tratados con TxS e infectados con HiNT375 Δ hyA que en ratones infectados con HiNT375 WT, a 24 hpi (p<0.01).

^fMayor reclutamiento de PMNs en lámina propia de vías aéreas altas de ratones infectados con HiNT375 WT que con HiNT375 Δ hyA, a 24 hpi (p<0.05).

^gMayor hemorragia alveolar en pulmones de ratones infectados con HiNT375 WT que con HiNT375 Δ hyA, a 12 hpi (p<0.05).

^hMayor proporción de PMNs en lumen de las vías aéreas altas (24 hpi) de animales infectados con HiNT375 WT no tratados con TxS e infectados con HiNT375 Δ hyA, a 12 hpi (p=0.005).

ⁱMayor proporción de PMNs en alveolos (12 hpi) de animales infectados con HiNT375 WT no tratados que tratados con TxS (p<0.05).

^jMayor hemorragia alveolar en pulmones de ratones infectados con HiNT375 WT a 12 que a 24 hpi (p<0.01).

^kMenor número de macrófagos alveolares en alveolos de ratones infectados con HiNT375 WT a 12 que a 24 hpi (p<0.01).

Capítulo 3

Caracterización de un modelo preclínico de infección aguda de pulmón enfisematoso murino, y su aplicación a la identificación de factores de virulencia de *Haemophilus influenzae* mediante Tn-seq

3.1. Resumen

El desarrollo y caracterización de modelos animales preclínicos para el estudio de la biología de la enfermedad y la valoración de nuevas terapias es esencial en el ámbito de las enfermedades infecciosas. La inducción de enfisema mediante administración de elastasa porcina pancreática (EPP) en un modelo animal murino es una estrategia utilizada en el estudio de la EPOC, y la infección aguda del sistema respiratorio de animales con enfisema pulmonar puede mimetizar parcialmente aspectos de los procesos de exarcebación asociados a la patología de naturaleza infecciosa.

En este Capítulo, presentamos una caracterización dual (patógeno y huésped) y multinivel (individuo, órgano y tejido) de un modelo de enfisema pulmonar murino infectado por *H. influenzae*. La dinámica de la infección bacteriana fue analizada mediante luminiscencia y cuantificación de carga. Los efectos de la lesión y la infección en el sistema respiratorio murino fueron analizados mediante pruebas de función ventilatoria, microtomografía computerizada y monitorización de la expresión génica. Además, el análisis del efecto de la exarcebación recurrente de naturaleza infecciosa reveló un impacto significativo en el pulmón enfisematoso. Por último, este modelo fue utilizado para realizar un escrutinio de factores de virulencia de *H. influenzae*, mediante infección pulmonar con una genoteca de mutantes generados por transposición e identificación de eventos mediante Tn-seq. Esta aproximación reveló un panel de genes bacterianos implicados en la infección pulmonar por *H. influenzae*, con potencial para su explotación futura como dianas terapéuticas en el desarrollo de nuevos antimicrobianos.

3.2. Introducción

El desarrollo y la caracterización exhaustiva de modelos animales acelera el progreso de nuestro conocimiento sobre las bases moleculares de las enfermedades infecciosas, así como el desarrollo y la valoración preclínica de vacunas y fármacos. La EPOC es una enfermedad multifactorial progresiva e irreversible cuyo tratamiento, basado principalmente en el uso de broncodilatadores y corticoides inhalados, tiene una eficacia clínica limitada (Barnes et al., 2015). El desarrollo de modelos animales que mimeticen las principales características de la enfermedad (bronquitis crónica, hipersecreción mucosa, remodelación de vías aéreas, enfisema, pérdida de función pulmonar y comorbilidades sistémicas asociadas) (GOLD, 2017), resulta esencial para desarrollar y proponer tratamientos efectivos. La exposición murina a humo de tabaco mimetiza varias características fisiopatológicas de la EPOC (Bracke et al., 2007; Churg et al., 2006; Pera et al., 2011). Sin embargo, la ausencia de estandarización de protocolos, equipos y estirpes animales utilizadas (Leberl et al., 2013), dificulta su uso como modelo de referencia. Alternativamente, existen varias aproximaciones que reproducen aspectos individuales de la enfermedad de forma aislada (Jones et al., 2017). Entre ellos, se encuentra la administración de enzimas proteolíticas como EPP, utilizada como inductor de enfisema por la facilidad con la que la lesión es generada, y por la posibilidad de modular la severidad controlando la cantidad de enzima administrada (Jones et al., 2017).

Las exacerbaciones o procesos de agudización de la EPOC contribuyen al progreso de la enfermedad y a la pérdida de función pulmonar (Donaldson et al., 2002). El patógeno oportunista *H. influenzae* coloniza las vías aéreas de pacientes EPOC durante fase estable, y está asociado a ~20-30% de las exacerbaciones de origen bacteriano (King, 2012). La ausencia de vacunas efectivas frente a cepas descapsuladas de *H. influenzae* determina el uso de antibióticos, principalmente β -lactámicos, para combatir la infección. Además, el uso profiláctico de antibióticos macrólidos como antiinflamatorios es también una práctica frecuente en pacientes EPOC en estado avanzado de la enfermedad (Barnes et al., 2015). Esta práctica favorece la aparición de cepas resistentes

(King, 2012; Tristram et al., 2007; Tsuji et al., 2018), lo que compromete el éxito terapéutico y la calidad de vida de los pacientes. Por todo ello, la identificación de nuevas dianas terapéuticas en HiNT para el desarrollo de nuevos fármacos antivirulencia presenta un gran interés clínico.

En este trabajo, realizamos una caracterización dual (huésped y patógeno) y multinivel (individuo, órgano y tejido) de un modelo de pulmón enfisematoso murino generado mediante instilación de EPP, y su posterior infección respiratoria por HiNT. Presentamos evidencias sobre el efecto fisiopatológico de la lesión enfisematosa, así como su impacto en la dinámica de la infección. Asimismo, este modelo fue utilizado para realizar un escrutinio genético *in vivo* e identificar genes de HiNT implicados en la infección pulmonar mediante Tn-seq. Este escrutinio reveló la importancia de genes bacterianos que codifican enzimas de rutas biosintéticas, respuesta a estrés, proteínas de superficie y proteasas, durante el proceso infeccioso por HiNT.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

H. influenzae RdKW20 y RdKW20*luxABCDE* (Xen21) (Caliper, PerkinElmer) (**Anexo I, Tabla A2**) fueron crecidas en agar chocolate o sBHI agar, a 37°C, 5% CO₂. Los cultivos líquidos se realizaron en sBHI a 37°C, 5% CO₂, en agitación. Cuando fue necesario, el medio se suplementó con Spec₁₅₀ (generación de genoteca de mutantes por transposición *in vitro*, ver **sección 3.3.10.1**) o Spec₅₀ (escrutinio *in vivo* Tn-seq, ver **sección 3.3.10.2**).

3.3.2. Curvas de crecimiento y cuantificación de luminiscencia bacteriana *in vitro*

Las cepas RdKW20 y Xen21 crecidas en agar chocolate durante 8 h fueron inoculadas (2-5 colonias) en 20 ml sBHI, y crecidas durante 12 h a 37°C y 200 r.p.m. Los cultivos se diluyeron en 40 ml de sBHI fresco a DO₆₀₀=0.01, y se determinó la DO₆₀₀ cada 8 h. La viabilidad bacteriana fue determinada mediante

dilución seriada y plaqueo en sBHI agar cada 2 h. La luminiscencia bacteriana se monitorizó cada hora mediante la transferencia de 100 μ l de cada cultivo a una placa negra de 96 pocillos (Eppendorf), y el empleo de un PhotonImager Optima (Biospace) con el programa Photo Acquisition v3.5 (Biospace) y 5 min de exposición. La cuantificación de cuentas bacterianas se realizó con el programa M3Vision (Biospace). Los resultados se expresan en DO_{600} , u.f.c./ml y cuentas, respectivamente. Cada ensayo se realizó por duplicado en al menos, tres ocasiones independientes ($n>6$).

3.3.3. Preparación de inóculos bacterianos para infección respiratoria murina

Se emplearon dos tipos de inóculos de las cepas RdKW20 y Xen21. Por una parte, biomasa bacteriana crecida en agar chocolate durante 12 h (bacterias en fase estacionaria), fue recogida y normalizada en PBS a $DO_{600}=1$ siguiendo (Euba et al., 2015b; Euba et al., 2015c; Euba et al., 2017; Fernandez-Calvet et al., 2018; Rodriguez-Arce et al., 2017). Alternativamente, se generaron inóculos bacterianos mediante cultivos en fase exponencial. Para ello, las cepas fueron crecidas en agar chocolate durante 8 h, inoculadas en 20 ml sBHI (2-5 colonias), crecidas durante 12 h a 37°C y 180 r.p.m., diluidas en 40 ml sBHI a $DO_{600}=0.1$, y crecidas en las mismas condiciones hasta $DO_{600}=0.5-0.6$. El volumen total del cultivo se distribuyó en alícuotas de 1 ml con 250 μ l glicerol 80%, conservadas a -80°C hasta su uso. La determinación de u.f.c./ml de las alícuotas generadas se realizó mediante dilución seriada en PBS (1:10) y plaqueo en agar chocolate, previo a su congelación, y de nuevo previo a su uso para infección, momento en el cual las alícuotas fueron descongeladas a TA, centrifugadas (5 min, 6.000 r.p.m.), y normalizadas a 10^{10} u.f.c./ml, en sBHI previamente atemperado.

3.3.4. Infección respiratoria murina, determinación de carga bacteriana, y generación de enfisema pulmonar

En todos los casos, se emplearon ratones hembra CD1 (Charles River) mantenidos en el Instituto de Agrobiotecnología siguiendo la legislación vigente

(véase **sección 1.3.10.**). En el momento de la infección, el peso de los animales fue de 25 ó 30 gr. La infección se realizó mediante administración intranasal o intratraqueal de inóculo bacteriano. La estimación de u.f.c./ml y u.f.c./ratón se especifica en la **Tabla 6**. Para la infección intranasal, se dispensaron 20 μ l de inóculo bacteriano en fase estacionaria en la entrada de las fosas nasales de animales previamente anestesiados (ketamina:xilacina, 1:3) hasta su completa inhalación. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a 24 y 48 hpi (animales 25 gr), o a 12, 24 y 30 hpi (animales 30 gr). Alternativamente, la infección se realizó con 20 μ l de cultivo bacteriano preservado en fase exponencial (animales 30 gr) y los animales se sacrificaron por dislocación cervical a 12, 24, 30 y 48 hpi. Para la infección intratraqueal (animales 30 gr), se administraron 20 μ l de cultivo bacteriano preservado en fase exponencial con una pipeta Hamilton (Hamilton) en animales previamente anestesiados con isoflurano (IsoVet). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical a 6, 12, 24, 30 y 48 hpi.

El enfisema pulmonar fue inducido por instilación intratraqueal de EPP (EPC, Elastin Products Company). Para ello, 10 mg conteniendo 1.350 unidades (U) de EPP fueron resuspendidos en 10 ml de suero salino fisiológico estéril (solución madre, 1 mg/ml; 135 U/ml). La inducción de la lesión se generó mediante administración de una única dosis de 90 μ l y 6 U EPP/ratón 17 días antes de la infección, mediante un catéter de 22 GA 0.9x25 mm (Becton-Dickinson), en ratones previamente anestesiados con isoflurano (IsoVet). Los animales control recibieron el mismo volumen (90 μ l) de solución vehículo (suero salino fisiológico).

La cuantificación de la carga bacteriana se monitorizó en pulmón, y cuando fue posible, en LBA. Las muestras de LBA se obtuvieron y procesaron como se indica en la **sección 1.3.10**. Los resultados se expresan como media \pm DE de \log_{10} u.f.c./ml LBA. Paralelamente, el pulmón izquierdo de cada animal fue diseccionado asépticamente, pesado individualmente en bolsas estériles (Stomacher80, Seward Medical), homogeneizado 1:10 (p/vol) en PBS, diluido y plaqueado en sBHI agar. Los resultados se expresan como media \pm DE de

Tabla 6. Protocolos de manipulación de ratones CDI llevados a cabo en este trabajo.

Figura	ID Experimento	Peso	EPP	Cepa HHNT	Vía	Inóculo administrado (vol ⁴)	u.f.c./ml; u.f.c./ratón	Anestesia	Muestra	Sacrificio (hpi ⁵)
34B (panel superior)	RH21	25 gr ¹	No	RdKW20 Xen21	In ²	Estacionario (20 µl)	RdKW20 = Xen21 1.34x10 ⁶ u.f.c./ml; 2.68x10 ⁸ u.f.c./ratón	K ³ ; X ⁶ (1-3), ip ⁷	Pulmón LBA ⁹	24 y 48
34B (panel inferior) y 35A	RH21-I	30 gr	No	RdKW20 Xen21	In	Estacionario (20 µl)	RdKW20 7x10 ⁸ u.f.c./ml; 1.4x10 ⁸ u.f.c./ratón Xen21 5.8x10 ⁶ ufc/ml; 1.16x10 ⁸ u.f.c./ratón	K-X; ip	Pulmón LBA	12, 24 y 30
34B (panel inferior) y 35A	RH21-I_COMP	30 gr	No	RdKW20 Xen21	In	Estacionario (20 µl)	RdKW20 1.62x10 ⁶ u.f.c./ml; 3.24x10 ⁹ u.f.c./ratón Xen21 1.29x10 ⁶ u.f.c./ml; 2.58x10 ⁸ u.f.c./ratón	K-X; ip	Pulmón LBA	12 y 30
35A y 35B	RH33	30 gr	No	Xen21	In	Exponencial (20 µl)	1.6x10 ⁶ u.f.c./ml; 3.2x10 ⁹ u.f.c./ratón	K-X; ip	Pulmón	12, 24, 30 y 48
35B	RH34	30 gr	Si	Xen21	It ³	Exponencial (20 µl)	2.05x10 ⁸ u.f.c./ml; 4.11x10 ⁷ u.f.c./ratón	K-X; ip	Pulmón	6, 12, 24, 30 y 48
37A	RH34-I	30 gr	Si	Xen21	It	Exponencial (20 µl)	1.84x10 ⁸ u.f.c./ml; 3.68x10 ⁹ u.f.c./ratón	K-X; ip	Pulmón	6, 12, 24, 30 y 48
40	RH34-V	30 gr	Si	Xen21	It	Exponencial (60 µl)	Infección 1 1.42x10 ⁷ u.f.c./ml; 8.53x10 ⁷ u.f.c./ratón Infección 2 1.34x10 ⁷ u.f.c./ml; 8.04x10 ⁷ u.f.c./ratón	Isoflurano 2%, inh ⁸	Pulmón	24 y 48
40	RH34-V-R	30 gr	Si	Xen 21	It	Exponencial (60 µl)	Infección 1 1.75x10 ⁸ u.f.c./ml; 1.05x10 ⁸ u.f.c./ratón Infección 2 1.85x10 ⁸ u.f.c./ml; 1.1x10 ⁸ u.f.c./ratón	Isoflurano 2%, inh	Pulmón	24, 48, 72 y 96

¹Gr, gramos; ²in, intranasal; ³it, intratraqueal; ⁴vol, volumen; ⁵h, ketamina; ⁶x, xilacina; ⁷ip, intraperitoneal; ⁸inh, inhalatoria; ⁹LBA, lavado broncoalveolar; ¹⁰hpi, horas post-infección.

\log_{10} u.f.c./pulmón. El homogeneizado pulmonar restante fue guardado a -80°C para determinación del contenido en ácidos grasos. El pulmón derecho fue diseccionado y dividido en secciones: (i) mantenido en formalina tamponada 10% a 4°C para evaluación histopatológica; (ii) lavado con PBS estéril, diseccionado en 2 fragmentos (30-100 mg/fragmento) congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y guardados a -80°C para extracción de ARN.

3.3.5. Análisis histopatológico

Los pulmones fijados fueron embebidos en parafina, y procesados tal y como se describe en la sección 2.3.15. Se evaluó la lesión enfisematosa y los parámetros de inflamación pulmonar (hiperemia, hemorragias alveolares, infiltrados de neutrófilos y presencia de macrófagos alveolares).

3.3.6. Determinación de ácidos grasos en pulmón murino

Se utilizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (*Gas Chromatography–Mass Spectrometry*, GC-MS) de los ésteres metílicos de ácidos grasos (*Fatty Acid Methyl Ester*, FAMES). Para la preparación de FAMES de pulmón murino, se emplearon homogeneizados de pulmón almacenados a -80°C (ver sección 3.3.4). Para ello, una fracción de 500 μl /homogeneizado pulmonar fue mezclada con 750 μl HCl-metanol (3N), 150 μl tolueno y 20 μl del control interno (C17:0, ácido heptadecanoico) (1 mg/ml), y se incubó a 90°C durante 1 h. A continuación, se añadieron 500 μl NaCl 0.9% y 500 μl hexano, se mezclaron vigorosamente, y se centrifugaron (2.000 r.p.m., 5 min) a TA. La fase orgánica (superior) (~ 300 μl) se transfirió a un tubo nuevo, se dejó evaporando durante la noche en una campana de gases a TA, y el sedimento obtenido se resuspendió en 100 μl hexano para su posterior análisis por GC-MS.

La GC-MS de FAMES se realizó en un dispositivo 7890A GC acoplado a un detector selectivo de masas MSD 5930C Inert XL (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.). Se inyectó un volumen de 1 μl en una columna Agilent J&W DB-WAX (diámetro, 0.25 mm; espesor de la película, 0.25 μm ; longitud, 30 m) con un flujo de helio de 1 ml/min. Los parámetros de inyección fueron:

inyección en modo *split* (1:10) y temperatura del inyector 250°C. El gradiente de temperatura fue: 1 min a 50°C; 25°C/min hasta 200°C; 3°C/min hasta 230°C; 18 min a 230°C; *solvent delay* de 5 min. La fuente se ajustó a 230°C y 70 electrovoltios (eV), 20 escaneos/min, de 40 a 500 masa/carga (m/z). Los FAMES se identificaron comparando sus espectros de masas con los de la quimioteca NIST, y comparando sus tiempos de retención con los de una mezcla patrón de FAMES (Sigma-Aldrich).

3.3.7. Extracción de ARN pulmonar murino, y análisis mediante qRT-PCR

Los fragmentos del pulmón derecho preservados a -80°C (ver **sección 3.3.4**) fueron descongelados en hielo, homogeneizados con T-10 Basic Ultra-turrax (IKA), y procesados con el método TRIZol (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante. El rendimiento de la purificación de ARN fue evaluado mediante RNA 6000 Nano LabChips (Agilent 2100 Bioanalyzer). Se procesaron únicamente muestras con ARN ribosomal 18S y 28S intacto. A partir del ARN total (1 µg), se sintetizó ADNc con los reactivos del kit PrimerScript RT Reagent (Takara). Para amplificar los genes *kc*, *tnf-α*, *sirt-1*, *mmp-2*, *mmp-12*, *nrf2* y *gapdh*, se emplearon 5 ng de ADNc/reacción como molde, en volumen final de 20 µl, incluyendo: 1X SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara), y el correspondiente par de cebadores diseñados con el *software Primer3* (**Anexo I, Tabla A4**). Los datos de fluorescencia fueron analizados con AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Las cantidades relativas de ARNm se calcularon usando el método de Ct y se normalizaron con el gen *gapdh* como control endógeno. Todas las medidas se realizaron por triplicado en al menos, tres ocasiones independientes (n>9).

3.3.8. Determinación de luminiscencia pulmonar, pruebas de función ventilatoria (PFV) y microtomografía computerizada (micro-CT)

Se emplearon ratones CD1 hembra (Charles River), mantenidos en las instalaciones del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) con número de registro ES31-2010000132, en condiciones libres de patógenos. El manejo

y procedimientos se realizaron con la autorización del CIMA, Comité de Ética y Experimentación Animal (Protocolos éticos 141-16E1 y E36-17/141-16E1) y del Gobierno Autonómico. Los animales se dividieron aleatoriamente en 5 grupos (n=10): (i) no manipulados (grupo CD1); (ii) animales que recibieron solución vehículo y no fueron infectados (V/Hi-); (iii) animales que recibieron EPP y no fueron infectados (E/Hi-); (iv) animales que recibieron solución vehículo y fueron infectados (V/Hi+); (v) animales que recibieron EPP y fueron infectados (E/Hi+). Se realizaron infecciones intratraqueales mediante administración de 60 μ l/ratón (**Tabla 6**) de cultivo bacteriano preservado en fase exponencial, en animales previamente anestesiados con isofluorano (IsoVet). Los animales fueron utilizados para: (i) estudio de la dinámica de la infección pulmonar mediante luminiscencia; (ii) análisis de PFV según (Artaechevarria et al., 2010; Artaechevarria et al., 2011); (iii) valoración de lesión pulmonar mediante toma y análisis de imágenes de micro-CT según (Artaechevarria et al., 2010; Artaechevarria et al., 2011).

3.3.8.1 Determinación de luminiscencia bacteriana durante la infección respiratoria

Los animales de los grupos CD1, V/Hi-, E/Hi-, V/Hi+ y E/Hi+ fueron anestesiados intraperitonealmente con ketamina:xilacina (1:3) (Imalgene®, Merial; Rompun®, Bayern, respectivamente) a 1, 3, 6, 9, 12 y 24 hpi. La toma de imagen se realizó en animales en posición ventro-dorsal con 15 min de exposición, utilizando un PhotonImager Optima (Biospace) y el programa Photo Acquisition v3.5 (Biospace). El procesamiento de imágenes se realizó con el programa M3Vision (Biospace). Los datos obtenidos se expresan como media \pm DE de cuentas.

3.3.8.2. PFV

Las PFV fueron realizadas en todos los animales previo a la adquisición de imágenes micro-CT, a 24 y 48 hpi, y a 1, 2 y 3 semanas post-infección (spi), cuando fue necesario. Los grupos fueron anestesiados intraperitonealmente

con ketamina:xilacina (1:3) (Imalgene®, Merial; Rompun®, Bayern, respectivamente), intubados intratraquealmente, y conectados a un ventilador Flexivent (Scireq) con parámetros de 200 respiraciones/min y volumen tidal de 10 ml/kg. Los animales se mantuvieron anestesiados por inhalación de isoflurano 2% hasta la finalización del procedimiento. Los parámetros de Resistencia (R, cmH₂O.s/mL), Compliancia (C, mL/cmH₂O) y Elastancia (E, cmH₂O.s/mL), fueron determinados por oscilación única de frecuencia forzada correspondiendo con el modelo pulmonar de un único compartimento. Todas las medidas fueron repetidas al menos cinco veces (n>50).

3.3.8.3. Micro-CT

Las imágenes tomográficas de pulmón fueron adquiridas utilizando X-ray micro-CT (Micro-CAT II, Siemens PreClinical Solutions) con los siguientes parámetros: voltaje de rayos-X 80 kV, corriente 500 microamperios (μA), tiempo de exposición 450 ms por proyección. Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente (ketamina:xilacina, 1:3), intubados, conectados a un ventilador Flexivent y mantenidos como se especifica en la **sección 3.3.8.2**. Se adquirieron 700 proyecciones durante 650 ms en condiciones de isopresión respiratoria a 12 cm H₂O. La respiración normal fue inducida mediante dos ciclos de respiración completa entre los periodos de isopresión. La capacidad pulmonar total se recuperó cada 20 respiraciones para evitar atelectasia. Se obtuvieron 640 cortes/imagen obtenida con tamaño de 46 μm y resolución de 1024x1024 pixeles/porción. Las imágenes micro-CT fueron reconstruidas con el programa Cobra (Exxim Computing Corporation), y procesadas para análisis preclínico con el *software* Amira 3D (Thermo Scientific).

3.3.9. Modelo de reinfección pulmonar murino

Se emplearon ratones hembra CD1 mantenidos en las instalaciones del CIMA, como se indica en la **sección 3.3.8**. El enfisema pulmonar fue inducido como se indica en la **sección 3.3.4**. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos (n=7): (i) V/Hi-; (ii) V/Hi+; (iii) E/Hi-; (iv) E/Hi+. Se realizaron dos

infecciones: (i) Infección 1 (día -7), 17 días después de la instilación de EPP o solución vehículo; (ii) Infección 2 (día 0), 24 días tras instilación con EPP o solución vehículo. Ambas infecciones se realizaron mediante administración intratraqueal de 60 µl (**Tabla 6**) de cultivo bacteriano preservado en fase exponencial en animales previamente anestesiados con isoflurano 2%. Tras la segunda infección, los animales fueron utilizados para: (i) determinación de carga bacteriana pulmonar a 24, 48, 72 y 96 hpi (ver **sección 3.3.4.**); (ii) PFV y micro-CT (según **secciones 3.3.8.2. y 3.3.8.3.**) a 24 y 48 hpi, y a 1, 2, 3, 6, 9 spi, y cuando fue necesario, a 12 spi (**Figura 32**).

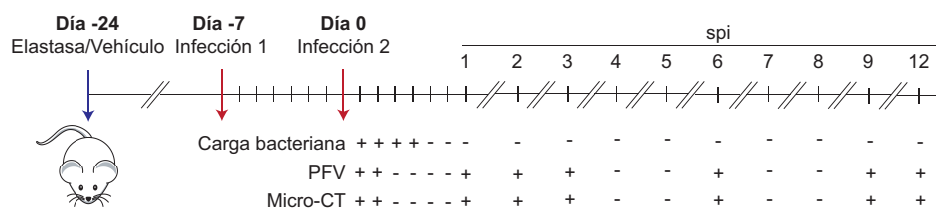


Figura 32. Modelo de exacerbación recurrente por infección bacteriana aguda. Ratones CD1 fueron tratados con solución vehículo o EPP (Día -24), e infectados intratraquealmente (Día -7, Infección 1; Día 0, Infección 2) con Xen 21. El modelo se analizó mediante: determinación de carga bacteriana pulmonar a 24, 48, 72 y 96 hpi; PFV y micro-CT a 24 y 48 hpi, y a 1, 2, 3, 6, 9 y 12 spi.

3.3.10. Generación de una genoteca de mutantes de *H. influenzae* mediante transposición *in vitro*, escrutinio Tn-seq *in vivo*, y análisis bioinformático

3.3.10.1. Generación de una genoteca de mutantes de *H. influenzae* mediante transposición *in vitro*

Se aisló ADN genómico de la cepa RdKW20 a partir de cultivos crecidos en sBHI hasta mitad de la fase exponencial ($DO_{600}=0.6$), utilizando QIAgen Genomic-tip 20/G (Qiagen). A continuación, se incubó 1 µg de ADN genómico con transposasa HimarC9 y 0.5 µg de plásmido pGSF8, como donador del transposón *marinerT7-MmeI*, que confiere resistencia a Spec. Tras la inactivación de la transposasa, los productos de transposición resultantes fueron reparados con ADN polimerasa del fago T4 y ADN ligasa de *E. coli*, y se usaron 500 ng de ADN mutagenizado para la transformación natural de RdKW20 (Herriott et al., 1970). El producto de la transformación se plaqueó en sBHI agar con Spec₁₅₀.

las colonias resultantes se recogieron como un *pool* y se crecieron en sBHI con Spec₁₅₀. A continuación, se almacenaron alícuotas de 1 ml en glicerol 15% a -80°C (**Figura 33A**).

3.3.10.2. Escrutinio *in vivo* Tn-seq de una genoteca de mutantes de *H. influenzae*

Se utilizaron ratones CD1 hembra (ver **sección 3.3.4.**) distribuidos aleatoriamente en dos grupos (n=10): (i) animales con función pulmonar normal; (ii) animales con enfisema pulmonar. Se realizó infección intranasal de animales previamente anestesiados (ketamina:xilacina, 1:3) con 20 μ l ($\sim 1.5 \times 10^9$ u.f.c./ml; $\sim 3 \times 10^7$ u.f.c./ratón) de una suspensión bacteriana de la genoteca de mutantes por transposición preservada en fase exponencial generada previamente. La cuantificación de la carga bacteriana inoculada se realizó mediante dilución seriada y plaqueo en sBHI agar con Spec₅₀. El inóculo bacteriano restante (alícuota descongelada, procesada y remanente no empleado en la infección murina) se plaqueó en su totalidad en 5 placas Petri (20 cm diámetro, 75 ml sBHI agar con Spec₅₀/placa), para su posterior recogida y procesado (**Figura 33B**).

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a 12 y 24 hpi. Ambos pulmones fueron procesados como una única muestra, para lo que fueron diseccionados conjuntamente en condiciones asépticas, pesados en bolsas estériles (Stomacher80, Seward Medical), y homogeneizados en 7.5 ml de PBS/muestra. El volumen total del homogeneizado pulmonar de cada animal fue plaqueado en 5 placas de Petri (20 cm diámetro, 75 ml sBHI agar con Spec₅₀/placa, 1.5 ml homogeneizado/placa), para su recogida y posterior procesamiento. En paralelo, una fracción de 100 μ l del homogeneizado fue empleada para cuantificar la carga pulmonar mediante dilución seriada (1:10) y plaqueo en sBHI agar con Spec₅₀. La biomasa bacteriana crecida tras el plaqueo de los homogeneizados pulmonares fue recogida en 5 ml sBHI+glicerol 15%/placa (25 ml/animal), resuspendida, y distribuida en alícuotas de 1 ml que fueron almacenadas a -80°C hasta su uso (**Figura 33B**).

Las alícuotas preservadas se emplearon para extracción y purificación de ADN genómico utilizando DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), tras dilución 1:10 de las mismas en PBS ($\sim 1 \times 10^7$ u.f.c./ml por extracción). El ADN genómico purificado fue cuantificado mediante Nanodrop One (Thermo Scientific), y utilizado como molde para realizar una PCR con *Phusion* polimerasa (ThermoFisher) y cebadores específicos del transposón Mariner-Tn-F y Mariner-Tn-R (**Anexo I, Tabla A4**), para confirmación de la presencia del transposón, generando un producto de amplificación de 1.136 pb. A continuación, 2 μg ADN genómico/muestra fueron digeridos en 200 μl con tampón CutSmart, S-adenosilmetionina 50 μM y 10 U *MmeI* (New England BioLabs, NEB) durante 4 h a 37°C, y desfosforilados con 1 U fosfatasa alcalina (Invitrogen) durante 30 min a 50°C. El producto de reacción fue purificado en dos pasos sucesivos, con 200 μl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y 200 μl cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El ADN fue precipitado con etanol, secado y resuspendido en 20 μl H₂O. Cada adaptador Tn-seq con un *barcode* de 6 pb, fue preparado combinando 5 nmol de dos oligonucleótidos complementarios (**Anexo I, Tabla A4**) en tampón Tris-EDTA 1x y NaCl 50 mM, en un volumen total 50 μl . La mezcla se incubó 10 min a 95°C, y se dejó enfriar lentamente a TA. Veinte μl de solución con 200 pmol de cada adaptador fueron fosforilados con T4 polinucleótido quinasa (3' fosfatasa *minus*) (NEB) en tampón de T4 DNA ligasa (NEB) durante 5 min a 37°C, e inactivados durante 10 min a 70°C. A continuación, se procedió a la ligación de 100 ng de los fragmentos de restricción *MmeI* desfosforilados con 2 pmol de adaptador fosforilado en tampón de ADN ligasa T4 con 2 U de ADN ligasa T4 (NEB) (volumen total, 20 μl) durante 1 h a 16°C. Inmediatamente después, se generaron las sondas de ADN para Tn-seq mediante PCR con 2.5 μl del producto de ligación como molde, 20 pmoles de los cebadores PBGSF23_NextSeq y PBGSF31 (**Anexo I, Tabla A4**), tampón HF, dNTPs 0.2 mM y 1 U *Phusion* polimerasa (volumen total, 50 μl). Condiciones de PCR: 72°C, 1 min y 98°C, 30 s; 28 ciclos de 98°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 10 s; 72°C 5 min. Cada producto de PCR resultante (~ 130 pb) se purificó con Minelute (Qiagen). Se generaron y agruparon 24 muestras identificables con 24 adaptadores distintos (6 pb/*barcode*) para su secuenciación

en un equipo Illumina Nextseq500 (Figura 33C y D).

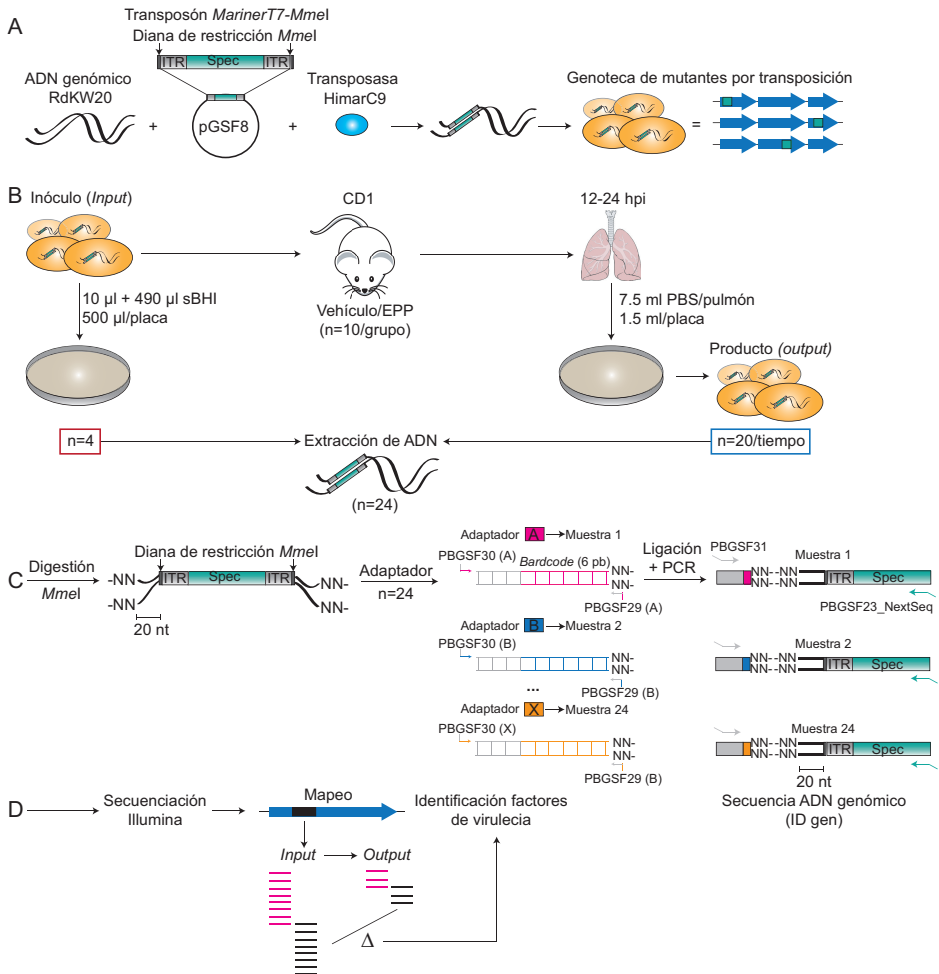


Figura 33. Representación esquemática del escrutinio *in vivo* de factores de virulencia mediante Tn-seq. (A) Generación de la genoteca de mutantes por transposición *in vitro* mediante inserción del transposón *MarinerT7* en el ADN genómico de RdKW20. (B) Escrutinio *in vivo* en ratones CD1, mediante infección intranasal con 20 µl/ratón de la genoteca generada, 17 días después de la instilación intratraqueal de EPP o solución vehículo. Los ratones fueron sacrificados a 12 y 24 hpi; ambos pulmones fueron procesados como una sola muestra, diseccionados asepticamente y homogeneizados en PBS. El volumen total del homogeneizado pulmonar (*output*), y el inóculo remanente utilizado en la infección (*input*), se plaquearon en sBHI agar con Spec₅₀. (C) El ADN extraído de las muestras *input* y *output* fue: (i) digerido con *MmeI*; (ii) procesado para incorporación de adaptadores específicos generados con cebadores PBGSF30 y PBGSF29 (ver **Tabla A4**); (iii) amplificado con cebadores PBGSF31 y PBGSF23_NextSeq, para obtener una secuencia con 20 pb de ADN específico de la cepa RdKW20 flanqueado con regiones específicas; (iv) secuenciación Illumina (D). La identificación génica se basó en la disminución de la abundancia relativa de mutantes de la genoteca pre- (*input*) y post-selección (*output*). Adaptada de (van Opijnen et al., 2009).

3.3.10.3. Análisis bioinformático del resultado de Tn-seq

Los archivos FASTQ con secuencias de 35 pb fueron importados en la interfaz basada en *web* Essentials (http://bamics2.cmbi.ru.nl/websoftware/essentials/essentials_start.php). El primer nucleótido de lectura se omitió, por calidad deficiente. Como resultado, sólo los últimos 5 pb de la secuencia de 6 pb de cada *barcode* estuvieron disponibles para el análisis de datos. Para su identificación, se permitió una discrepancia de 2 pb. Tras eliminar los 5 pb y las secuencias del transposón, la longitud de la secuencia genómica flanqueante restante se estableció en 17 pb. Se realizó un alineamiento de esta secuencia con el genoma de *H. influenzae* RdKW20 (coincidencia de al menos 15 pb). Los datos de recuento (*pseudoreads*) se generaron por lectura de secuencia única y por gen. Los *pseudoreads* de las muestras procedentes de animales con función pulmonar normal y con enfisema pulmonar fueron comparados para detectar diferencias significativas ($p < 0.001$) mediante el método de máxima verosimilitud condicional ajustado por cuantil (qCML), suponiendo una dispersión moderada de las réplicas. Se utilizó un valor de p ajustado por Benjamin-Hochberg (B-H) de 0.05. La esencialidad génica se determinó comparando el número esperado de lecturas/gen (basado en el número de sitios de inserción por gen, el tamaño de la genoteca y la profundidad de secuenciación) con el número medido de lecturas/gen. Los mutantes no detectados fueron considerados mutantes en genes esenciales, y se omitieron del análisis de datos.

3.3.11. Análisis estadístico

En todos los casos, un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron con el programa Prism versión 7, paquete estadístico para Mac (GraphPad Software), y se detallan en cada pie de figura.

3.4. Resultados

3.4.1. Caracterización de la cepa *H. influenzae* Xen21

La cepa Xen21 deriva de RdKW20, generada mediante inserción genómica

del operón *luxABCDE* (PerkinElmer). Se realizó un análisis comparado de las cepas RdKW20 y Xen21. El crecimiento bacteriano se determinó mediante monitorización de DO_{600} , viabilidad bacteriana (u.f.c./ml) y emisión de luminiscencia (PhotonImager, 5 min exposición) en medio sBHI. La cepa Xen21 mostró crecimiento comparable al de RdKW20, y emisión de luminiscencia (Figura 34A).

A continuación, ratones hembra CD1 (25 y 30 gr) fueron infectados intranasalmente con 20 μ l de inóculo bacteriano en fase estacionaria (ver secciones 3.3.3, 3.3.4 y Tabla 6). Los ratones fueron sacrificados a 24 y 48 hpi (animales de 25 gr) y, a 12, 24 y 30 hpi (animales de 30 gr). La carga bacteriana

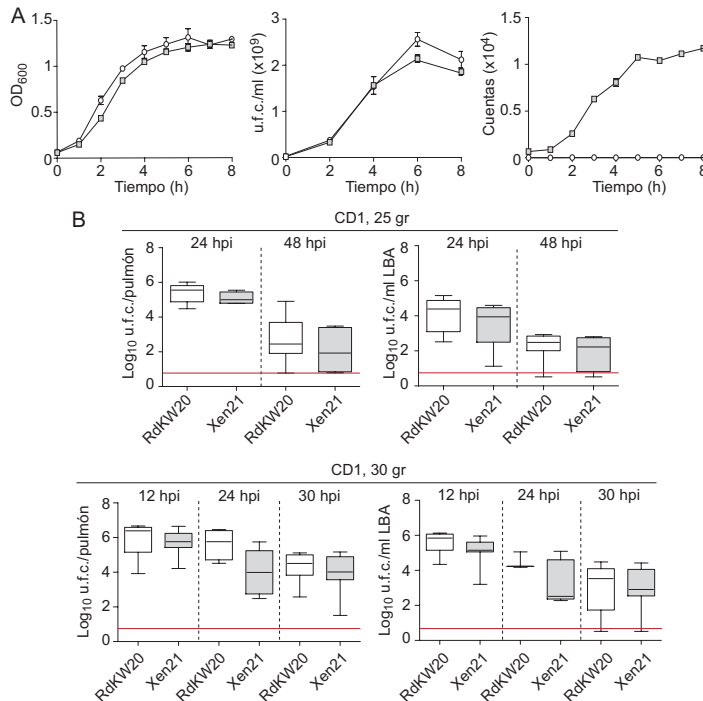


Figura 34. Caracterización de la cepa *H. influenzae* Xen21, RdKW20luxABCDE. (A) Crecimiento de RdKW20 (círculo blanco) y Xen21 (cuadrado gris) en sBHI. Se monitorizó: (i) DO_{600} (panel izquierdo); (ii) viabilidad (panel central); (iii) luminiscencia (panel derecho). Los datos se muestran como media \pm DE de DO_{600} , u.f.c./ml y cuentas, respectivamente. (B) Infección intranasal de ratones CD1 de 25 (panel superior) ó 30 gr (panel inferior) con inóculo bacteriano en fase estacionaria de la cepa RdKW20 (blanco) o Xen21 (gris). Los animales fueron sacrificados en los tiempos indicados, y la carga bacteriana determinada en pulmón (izquierda) y LBA (derecha). Los datos se expresan como media \pm DE de log_{10} u.f.c./pulmón y log_{10} u.f.c./ml LBA, respectivamente. Línea roja: límite de detección del experimento.

en pulmón y LBA fue comparable en animales infectados por RdKW20 y Xen21, de 25 ó 30 gr (**Figura 34B**).

El trabajo presentado a continuación en este Capítulo fue realizado con la cepa *H. influenzae* Xen21.

3.4.2. Optimización de las condiciones de infección respiratoria murina por *H. influenzae* Xen21

Para optimizar las condiciones de emisión de bioluminiscencia de la cepa Xen21 *in vivo*, se prepararon inóculos bacterianos en fase estacionaria, y alternativamente, en fase exponencial (ver **sección 3.3.3.**). Para ello, se prepararon alícuotas de 1 ml con 250 μ l glicerol 80%, conservadas a -80°C . Previo a su uso, dichas alícuotas fueron descongeladas a TA, centrifugadas (5 min, 6.000 r.p.m.), y normalizadas en sBHI previamente atemperado. A continuación, realizamos una infección pulmonar de ratones (30 gr) mediante administración intranasal de 20 μ l (**Tabla 6**) de suspensiones bacterianas de la cepa Xen21. Los animales fueron sacrificados a 12, 24 y 30 hpi, y la carga bacteriana pulmonar fue cuantificada. No se observaron diferencias significativas, si bien los resultados obtenidos fueron más homogéneos tras la infección con bacterias en fase exponencial (**Figura 35A**). Por esta razón, los experimentos presentados a continuación fueron realizados mediante infección con la cepa Xen21 en fase exponencial.

Para maximizar los efectos de la infección pulmonar, comparamos dos vías de administración del inóculo bacteriano: intranasal e intratraqueal. Infectamos animales de 30 gr con 20 μ l (**Tabla 6**) de una suspensión de Xen21, para su posterior sacrificio a 12, 24, 30 y 48 hpi. La carga bacteriana pulmonar fue comparable, si bien la infección intratraqueal generó recuentos por encima del límite de detección experimental a 48 hpi (**Figura 35B**). En paralelo, la luminiscencia bacteriana fue monitorizada. La infección intranasal no permitió detectar luminiscencia pulmonar, limitando la señal a cavidad nasal y 6 hpi. Por el contrario, la infección intratraqueal permitió detectar luminiscencia

en ambos pulmones y hasta 24 hpi (**Figura 35C**). La imagen tomográfica obtenida mediante micro-CT a 24 hpi muestra signos de inflamación pulmonar compatibles con un proceso neumónico, más evidentes en animales infectados por vía intratraqueal que intranasal (**Figura 35D**).

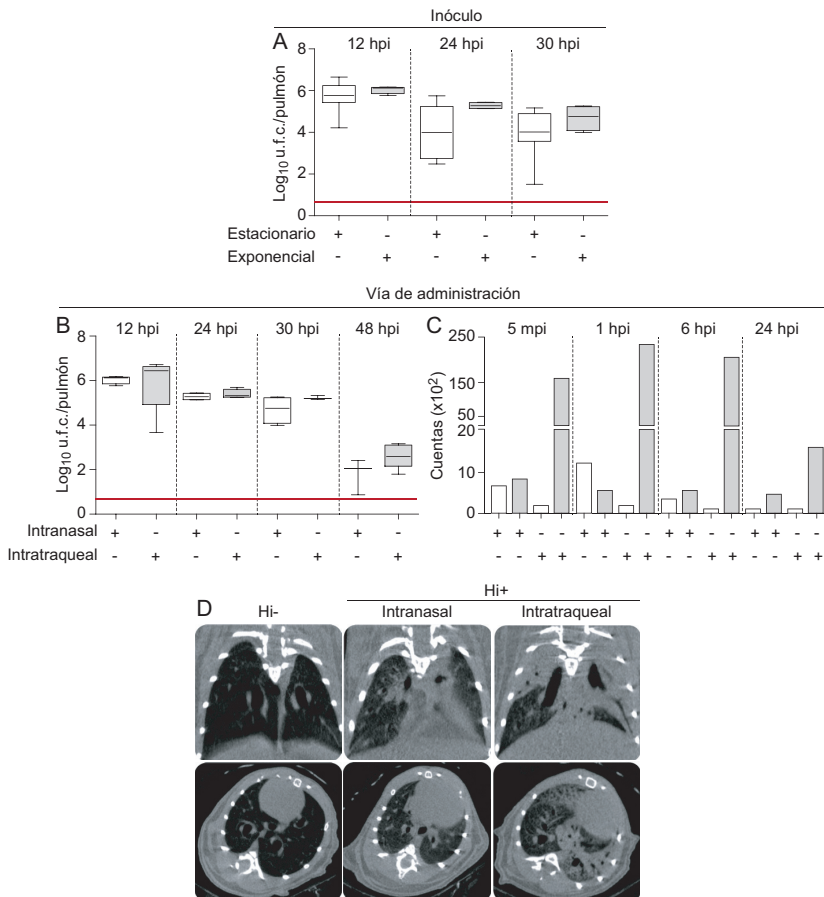


Figura 35. Optimización de la infección pulmonar murina por *H. influenzae* Xen21: inóculo bacteriano (A), y vía de administración (B-D). (A) Infección intranasal de ratones CD1 (30 gr) con 20 μ l de Xen21 en fase estacionaria (blanco) o exponencial (gris). La carga bacteriana fue determinada en pulmón, y se muestra como media \pm DE de \log_{10} u.f.c./pulmón. (B) Infección de ratones CD1 (30 gr) con bacterias en fase exponencial administradas por vía intranasal (blanco) o intratraqueal (gris). La carga bacteriana se determinó en pulmón, mostrada como media \pm DE de \log_{10} u.f.c./pulmón. Línea roja, límite de detección del experimento. (C) Luminiscencia bacteriana detectada en cavidad nasal (blanco) y pulmón (gris) en animales infectados por vía intranasal o intratraqueal. Los datos se muestran como media \pm DE de cuentas. (D) Imágenes micro-CT representativas de cortes longitudinal (panel superior) y transversal (panel inferior) de animales infectados con Xen21 por vía intranasal (izquierda) e intratraqueal (derecha).

En base a estos resultados, el trabajo presentado a continuación fue realizado con *H. influenzae* Xen21 crecida en fase exponencial y administrada por vía intratraqueal.

3.4.3. Generación de enfisema pulmonar murino mediante instilación de elastasa porcina pancreática

A continuación, caracterizamos un modelo de enfisema pulmonar murino cuya lesión fue generada mediante instilación de EPP según (Artaechevarria et al., 2010; Artaechevarria et al., 2011) (E/Hi-), y evaluada tras 17 días mediante PFV y micro-CT (**Figura 36**). Los animales control recibieron la misma cantidad de solución vehículo (suero salino fisiológico) (V/Hi-). Los animales V/Hi- presentaron valores de PFV comparables a animales no manipulados (CD1). Los animales E/Hi- mostraron mayor complianza (C), y menor resistencia (R) y elastancia (E) que los animales V/Hi- (**Figura 36A**). Estos resultados sugieren aumento de la capacidad de expansión pulmonar y reducción de la resistencia al flujo aéreo asociado a la lesión. Las imágenes micro-CT de animales E/Hi- presentaron menor densidad tisular (imagen más oscura e intensa), abombamiento pulmonar con redondeamiento del ápex y base pulmonar, y pulmones de mayor tamaño, embebidos en los espacios intercostales (**Figura 36B**).

Por otro lado, la composición pulmonar de ácidos grasos puede sufrir alteraciones en condiciones patológicas (Henderson et al., 1994; Schmidt et al., 2002), hecho que ha sido descrito en el pulmón EPOC, donde estos actúan como precursores inflamatorios (Granata et al., 2009; Malhotra et al., 2012; Wood et al., 2009). En concreto, el ácido araquidónico liberado por acción de la fosfolipasa-2, actúa como sustrato en reacciones cuyos productos son eicosanoides con acción inflamatoria (Degousee et al., 2002; Malhotra et al., 2012; Pniewska & Pawliczak, 2013; Schwartz, 2000). Por ello, hipotetizamos que la lesión pulmonar podría acompañarse de un cambio en el perfil de ácidos grasos del pulmón enfisematoso con respecto al pulmón control. El análisis GC-MS de la composición pulmonar de FAMES presentó el mismo perfil de ácidos grasos en ambos tipos de muestras, con ácidos grasos saturados, mirístico

(C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y behénico (C22:0); e insaturados, palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), eicosenoico (C20:1), eicosadienoico (C20:2), eicosatrienoico (C20:3), araquidónico (C20:4), erúcido (C22:1), docosatetraenoico (C22:4) y docosahexaenoico (C22:6) (Figura 36C y (Fernandez-Calvet et al., 2018)).

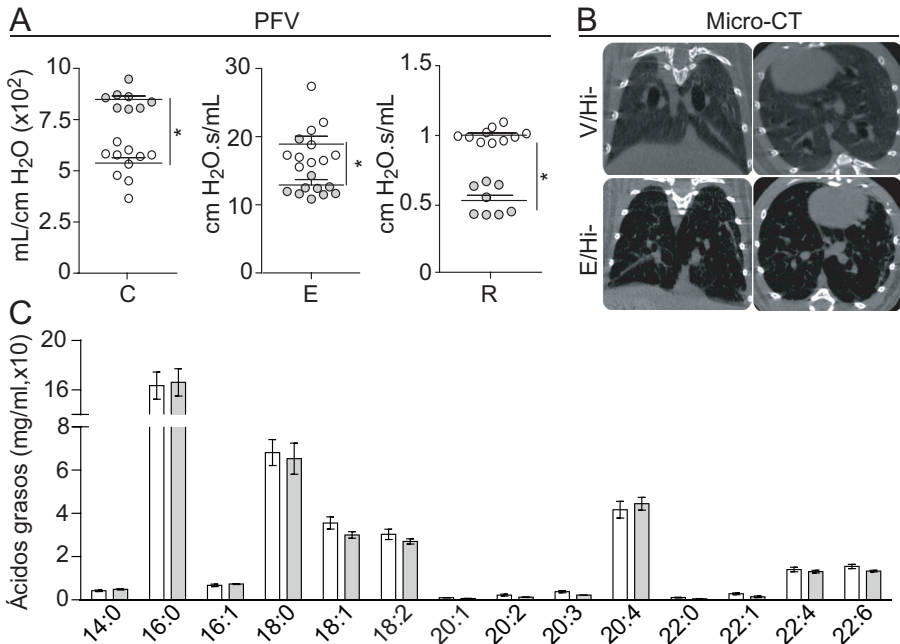


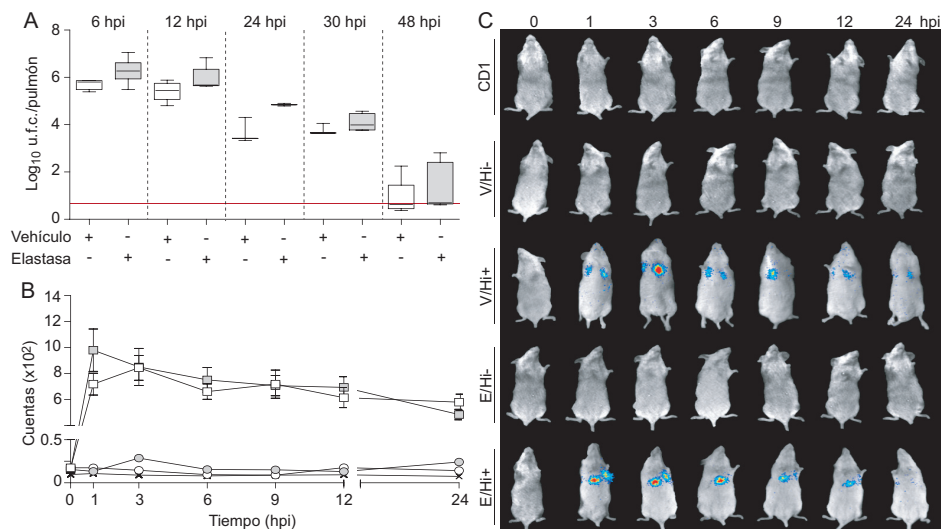
Figura 36. La instilación de EPP induce lesión pulmonar compatible con enfisema. Se realizó instilación intratraqueal de EPP (E/Hi-). En paralelo, los animales control recibieron solución vehículo (suero salino fisiológico) (V/Hi-). La lesión fue evaluada tras 17 días mediante PFV (A) y micro-CT (B). (A) Los animales E/Hi- (gris) presentaron mayor complianza (C, panel izquierdo), y menor elastancia (E, panel central) y resistencia (R, panel derecho) que los animales V/Hi- (blanco). Los resultados se muestran como media ± DE, comparación estadística, *t-test* de dos colas (*diferencias significativas). (B) Imágenes representativas de micro-CT, corte longitudinal (panel izquierdo) y transversal (panel derecho). Los pulmones de ratones E/Hi- (panel inferior) presentan menor densidad de tejido y expansión pulmonar anormal en comparación con animales V/Hi- (panel superior). (C) Determinación de la composición pulmonar murina total de ácidos grasos mediante GC-MS; V/Hi- (blanco); E/Hi- (gris). Los datos se muestran como media ± DE. Comparación estadística, *t-test* de dos colas.

En conjunto, la instilación intratraqueal de EPP genera lesiones compatibles con el desarrollo de un enfisema pulmonar en ratones CD1, modifica los parámetros de función ventilatoria, y no altera el perfil de ácidos grasos del

pulmón.

3.4.4. Infección aguda del pulmón enfisematoso murino por HiNT

A continuación, se analizó el efecto de la infección respiratoria por Xen21 en el pulmón enfisematoso. Para ello, se realizó la infección intratraqueal de ratones CD1 con 60 μ l de bacterias en fase exponencial (**Tabla 6**), 17 días después de la instilación de EPP (E/Hi+), y en animales que recibieron solución vehículo (V/Hi+). Los animales se sacrificaron a 6, 12, 24, 30 y 48 hpi. Los recuentos bacterianos fueron mayores en animales E/Hi+ que V/Hi+, si bien estas diferencias no fueron significativas (**Figura 37A**). El análisis de luminiscencia bacteriana en los grupos V/Hi, V/Hi+, E/Hi- y E/Hi+ mostró emisión de luminiscencia únicamente en los grupos V/Hi+ y E/Hi+, en ambos pulmones y hasta 24 hpi, sin diferencias significativas en intensidad y extensión de la señal entre grupos (**Figura 37B y C**).



3.4.5. La inducción de enfisema retrasa la recuperación pulmonar tras infección por HiNT

A continuación, empleamos PFV y micro-CT para analizar los cambios pulmonares asociados a la infección por HiNT. Las PFV en animales V/Hi+ mostraron menor C, mayor E y R a 24 (C, $p<0.01$; E, $p<0.01$; R, $p<0.001$) y a 48 (C, $p<0.05$; E, $p<0.001$; R, $p<0.001$) hpi que las obtenidas en animales V/Hi-. Los valores de PFV en animales infectados recuperaron los valores control a 1 spi (**Figura 38A, panel superior**). Las imágenes micro-CT del grupo V/Hi+ mostraron signos inflamatorios en ambos pulmones, cuya gravedad y extensión se correlaciona con las PFV, con signos iniciales a 24 hpi, pico inflamatorio a 48 hpi, y recuperación a 1 spi (**Figura 38A, panel inferior**).

Las PFV realizadas en animales E/Hi+ también mostraron menor C, y mayor E y R a 24 (C, $p<0.01$; E, $p<0.01$; R, $p<0.001$) y 48 (C, $p<0.001$; E, $p<0.001$; R, $p<0.001$) hpi que en animales E/Hi-. Sin embargo, los valores de PFV se mantuvieron alterados a 1 spi (C, $p<0.001$; E, $p<0.001$; R, $p<0.001$). Para determinar la dinámica de recuperación del pulmón enfisematoso tras la infección, se evaluaron los mismos animales a 2 y 3 spi (**Figura 38B, panel superior**). Las imágenes tomográficas pulmonares de E/Hi+ se correlacionan con los resultados de PFV. Los signos inflamatorios fueron detectables a 24 hpi, más evidentes a 48 hpi, alcanzaron un pico máximo a 1 spi, y se observó recuperación inflamatoria parcial a 2 spi, y total a 3 spi. La lesión enfisematosa estuvo presente en todos los tiempos analizados (**Figura 38B, panel inferior**).

En paralelo, se procedió a un análisis de lesiones histopatológicas en muestras pulmonares de animales V/Hi-, E/Hi-, V/Hi+ y E/Hi+, sacrificados a 24 y 48 hpi, y 1 spi (**Tabla 7**). La lesión enfisematosa estuvo presente en pulmones de animales E/Hi- y E/Hi+ en comparación con sus respectivos animales control V/Hi- y V/Hi+ (todos, $p<0.005$). Los pulmones de animales E/Hi- presentaron mayor número de macrófagos alveolares que los de animales V/Hi- ($p<0.05$), confirmando que la instilación de EPP induce inflamación pulmonar. Por otro lado, la infección por HiNT indujo, independientemente del estado pulmonar,

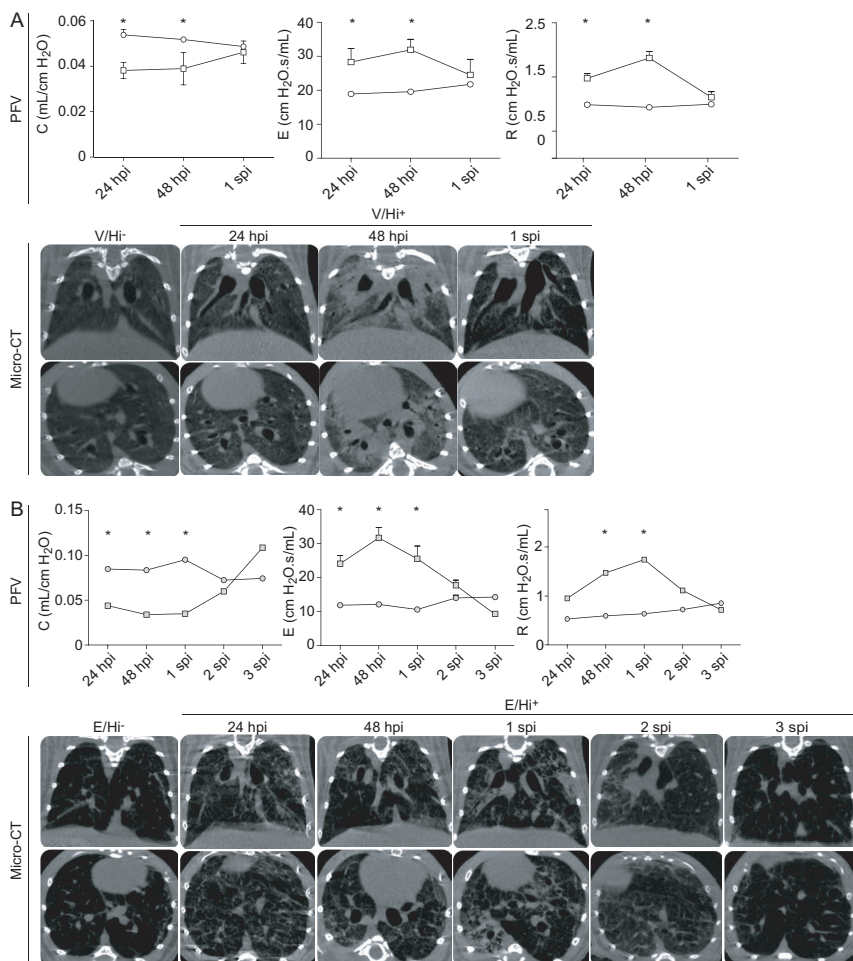


Figura 38. La infección respiratoria por HiNT modifica los PFV e induce inflamación pulmonar murina.

Se realizó infección intratraqueal murina con Xen21 en fase exponencial, 17 días tras la instalación de EPP o solución vehiculo. Las PFV fueron realizados en todos los casos previo a la adquisición de imágenes micro-CT. **(A)** PFV (panel superior) y micro-CT (panel inferior) de animales V/Hi- y V/Hi+. El grupo V/Hi+ (cuadrado) presenta menor complianza (C, panel izquierdo), mayor resistencia (R, panel central) y elastancia (E, panel derecho) que el V/Hi- (círculo). La alteración de PFV es mayor a 48 que a 24 hpi, recuperando valores control a 1 spi. Los valores se muestran como media ± DE. Comparación estadística, ANOVA de dos colas (prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni) (*diferencias significativas). Imágenes representativas de micro-CT de V/Hi- (izquierda), y V/Hi+ a 24, 48 y 1 spi (derecha); cortes longitudinales (superior) y transversales (inferior). **(B)** PFV (panel superior) y micro-CT (panel inferior) de animales E/Hi- y E/Hi+. Los ratones E/Hi+ (cuadrado) presentan menor C (panel izquierdo) y mayor E (panel central), y R (panel derecho) que E/Hi- (círculo). La alteración de parámetros se observa a 24 y 48 hpi, alcanza un pico a 1 spi, con recuperación parcial a 2-, y total a 3 spi. Los valores se muestran como media ± DE. Comparación estadística, ANOVA de dos colas (prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni) (*diferencias significativas). Imágenes representativas de micro-CT de E/Hi- (izquierda), y E/Hi+ a 24 y 48 hpi, y a 1, 2 y 3 spi (derecha); cortes longitudinales (superior) y transversales (inferior).

Tabla 7. Evaluación de lesiones histopatológicas en pulmón sano y enfisematoso procedente de animales no infectados (V/Hi- y E/Hi-) e infectados (V/Hi+ y E/Hi+).

	Puntuación de lesiones histopatológicas (media ± DE)								
	Hiperemia	Hemorragia alveolar	Macrófagos alveolares	Bronquiolos, alveolos, septos		Bronquios		Edema	Enfisema
				PMN ¹	Linfocitos	PMN luz	PMN pared		
V/Hi-	0.70±0.27	0±0	0±0 ^{e,h}	0.20±0.27 ^k	0±0	ND	ND	0±0	0±0 ^t
V/Hi+, 24 hpi	1.00±0.32 ^a	0.33±0.41	1±0.32 ^{e,f,j}	1.75±0.52 ^{k,l}	0±0	0.33±0.41	0.33±0.41	0±0	0±0
V/Hi+, 48 hpi	0.57±0.19 ^{a,c}	0.21±0.39	1.50±0 ^{e,f,g}	2.50±0.4 ^{k,l,m}	0.14±0.38	1.20±0.85 ^p	0±0	0±0	0.10±0.22
V/Hi+, 1 spi	1.00±0.71	0.50±0.58	1.25±0.29 ^{e,g}	1.13±0.75 ^{k,m}	0±0	0±0 ^p	0.50±0.48	1.00±1.15	0±0
E/Hi-	0.88±0.48	0.38±0.75	0.50±0 ^{g,h,i}	0.38±0.25 ⁿ	0±0	0.13±0.25	0±0 ^t	0±0	1.63±0.85 ^t
E/Hi+, 24 hpi	0.70±0.27 ^b	0.40±0.22 ^d	1.40±0.22 ^{h,i,j}	1.90±0.55 ^{n,o}	0±0	1.33±1.10	0±0	0±0	1.90±0.42
E/Hi+, 48 hpi	1.10±0.22 ^{b,c}	0.20±0.27	1.40±0.22 ^{h,i}	2.10±0.42 ^{n,o}	0.40±0.55	1.25±1.00 ^q	0±0 ^s	0±0	2.00±0.35
E/Hi+, 1 spi	0.89±0.21	0±0 ^d	1.11±0.42 ^{h,i}	0.44±0.39 ^o	0.44±0.53	0.17±0.33 ^q	0.67±0.53 ^{r,s}	0±0	1.11±0.55

¹PMN, infiltrado de neutrófilos

²ND, No Determinado

^aHiperemia mayor en animales V/Hi+ a 24 que a 48 hpi (p<0.05).

^bMayor hiperemia de pulmón E/Hi+ a 48 que a 24 hpi (p<0.05).

^cMayor hiperemia de pulmón V/Hi+ a 48 que en animales E/Hi+, a 48 hpi (p<0.01).

^dHemorragias alveolares mayores en animales E/Hi+ a 24 hpi que a 1 spi (p<0.001).

^eMayor reclutamiento de macrófagos alveolares en pulmón de ratones V/Hi+ a 24 y 48 hpi y a 1 spi que en pulmón de ratones V/Hi- (p<0.0001).

^fMayor presencia de macrófagos alveolares en pulmón de ratones V/Hi+ a 48 que a 24 hpi (p<0.01).

^gMayor número de macrófagos alveolares en ratones V/Hi+ a 48 hpi que a 1 spi (p<0.05).

^hMayor reclutamiento de macrófagos alveolares en E/Hi- que V/Hi- (p<0.0001).

ⁱMayor reclutamiento de macrófagos alveolares en pulmón de ratones E/Hi+ a 24 y 48 hpi, y a 1 spi que en ratones E/Hi- (p<0.0001).

^jMayor reclutamiento de macrófagos alveolares en pulmón de ratones E/Hi+ que en V/Hi+ a 24 hpi (p<0.05).

^kMayor número de PMN en bronquiolos de ratones V/Hi+ que en bronquiolos de ratones V/Hi- a 24 y 48 hpi, y a 1 spi (p<0.05).

^lMayor infiltración de PMN en bronquiolos de ratones V/Hi+ a 48 que a 24 hpi (p<0.05).

^mMayor reclutamiento de PMN en bronquiolos de ratones V/Hi+ a 48 hpi que a 1 spi (p<0.01).

ⁿMayor número de PMN en bronquiolos de ratones E/Hi+ a 24 y 48 hpi que en bronquiolos de ratones E/Hi- (p<0.001).

^oMayor número de PMN en bronquiolos de ratones E/Hi+ a 24 y 48 hpi que en bronquiolos de animales E/Hi+ a 1 spi (ambas, p<0.0001).

^pMayor reclutamiento de PMN en luz de bronquios de animales V/Hi+ a 48 hpi que en luz de bronquios de V/Hi+ a 1 spi (p<0.05).

^qMayor infiltración de PMN en la pared de bronquios de animales E/Hi+ a 48 hpi que luz de bronquios de V/Hi+ a 1 spi (p<0.05).

^rMayor reclutamiento de PMN en la pared de bronquios de animales E/Hi+ que E/Hi- a 1 spi (p<0.05).

^sMayor presencia de PMN en la pared de bronquios de animales E/Hi+ a 1 spi que E/Hi+ a 48 hpi (p<0.05).

^tLesión compatible con enfisema pulmonar identificada en animales previamente tratados con elastasa (p<0.05).

reclutamiento de macrófagos alveolares (V/Hi+, a 24, 48 y 1 spi, $p<0.0001$; E/Hi+, a 24, 48 y 1 spi, $p<0.0001$) y PMN en bronquiolos (V/Hi+, 24, 48 y 1 spi, $p<0.05$; E/Hi+, 24, 48 hpi, $p<0.01$), en comparación con sus respectivos animales control V/Hi- y E/Hi-. En animales V/Hi+, el reclutamiento de macrófagos fue mayor a 48 hpi que a 24 hpi y 1 spi (24 hpi, $p<0.01$; 1 spi, $p<0.05$), coincidiendo con el pico inflamatorio observado en el micro-CT (**Figura 38A**). En animales E/Hi+, el número de macrófagos se mantuvo estable en los tiempos analizados. En animales V/Hi+, se obtuvieron recuentos mayores de PMN a 48 hpi que a 24 hpi y 1 spi (24 hpi, $p<0.05$; 1 spi, $p<0.01$). En animales E/Hi+, se observó mayor número de PMN a 24 y 48 hpi que a 1 spi (ambos, $p<0.001$). En los grupos V/Hi+ y E/Hi+, el número de PMN en la luz de los bronquios fue mayor a 48 hpi que a 1 spi (ambos, $p<0.05$). La lesión hiperémica pulmonar típica de bronconeumonía aguda (Euba et al., 2015b) fue mayor en animales V/Hi+ y E/Hi+ a 48 que a 24 hpi (V/Hi+, $p<0.05$; E/Hi+, $p<0.05$); y mayor en animales E/Hi+ que en V/Hi+ a 48 hpi ($p<0.01$). No se observaron diferencias en el resto de los parámetros analizados (hemorragias alveolares, PMN en luz de bronquios, reclutamiento de linfocitos).

En conjunto, la infección por HiNT modifica los PFV e induce inflamación pulmonar, independientemente del estado del pulmón, si bien la recuperación al estado basal está comprometida en el pulmón enfisematoso. Asimismo, el enfisema induce inflamación pulmonar, caracterizada por el reclutamiento de macrófagos y PMN, que se amplifica durante la infección por HiNT.

3.4.6. La infección respiratoria por HiNT modula la expresión génica en pulmón

El aumento de células inflamatorias observado tras la infección pulmonar con HiNT nos llevó a analizar la expresión pulmonar de los marcadores proinflamatorios KC y TNF- α . No se observaron diferencias significativas en la expresión de *kc* y *tnf- α* entre los grupos no infectados V/Hi- y E/Hi-. Los animales infectados, V/Hi+ y E/Hi+, presentaron mayor expresión de *kc* y *tnf- α* a 24 y 48 hpi (V/Hi+: 24 hpi, $p<0.05$, 48 hpi, $p<0.01$; E/Hi+: 24 hpi, $p<0.05$)

que sus respectivos controles no infectados. A 1 spi, la expresión de ambos marcadores fue comparable en animales infectados y no infectados (**Figura 39A**).

Las MMPs están implicadas en destrucción de paredes alveolares y desarrollo de enfisema, y sus niveles se relacionan con la gravedad de la EPOC (Horio et al., 2017; Koo et al., 2016; Loffek et al., 2011). Los pulmones del grupo E/Hi- presentaron mayor expresión de *mmp-2* y *mmp-12* que los del grupo V/Hi- (**Figura 39B**). La infección por HiNT provocó una disminución en la expresión de *mmp-2* (V/Hi+: 24 hpi, $p < 0.005$, 48 hpi, $p < 0.0005$; E/Hi+: 24 hpi, $p < 0.0001$, 48 hpi, $p < 0.0005$), y *mmp-12* (V/Hi+: 24 hpi, $p < 0.0001$; 48 hpi, $p < 0.0005$; E/Hi+: 24 hpi, $p < 0.005$, 48 hpi, $p < 0.05$), a 24 y 48 hpi en comparación a los grupos V/Hi- y E/Hi-, respectivamente. A 1 spi, la expresión en V/Hi+ y E/Hi+ de *mmp-12* recuperó niveles comparables a los de animales no infectados; sin embargo, la expresión de *mmp-2* en E/Hi+, se mantuvo más baja que en el grupo E/Hi- ($p < 0.005$) (**Figura 39B**).

Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión de la maquinaria celular antioxidante (Vucic et al., 2014), se activa en respuesta a la exposición del humo de tabaco y, está implicado en la regulación del proceso inflamatorio de las vías aéreas asociado a la infección pulmonar por HiNT (Lugade et al., 2011). La expresión de *nrf2* tendió a aumentar en el grupo E/Hi- respecto al V/Hi- (diferencia no significativa). Sin embargo, la infección por HiNT disminuyó la expresión de *nrf2* en el grupo V/Hi+ a 48 hpi, respecto a V/Hi- ($p < 0.05$), recuperando niveles basales a 1 spi. En animales E/Hi+, la expresión de *nrf2* fue menor que la observada en el grupo E/Hi- a todos los tiempos analizados (24 hpi, $p < 0.05$; 48 hpi y 1 spi, $p < 0.01$) (**Figura 39C**).

La sirtuina 1 (Sirt-1) es una histona deacetilasa cuya expresión disminuye en el pulmón de fumadores y pacientes con EPOC/enfisema respecto a individuos no fumadores y sanos (Rajendrasozhan et al., 2008; Yao et al., 2012), y está implicada en el control de los procesos de inflamación, envejecimiento celular y degradación de parénquima pulmonar (Gao et al., 2015). En el pulmón de

ratones E/Hi-, la expresión de *sirt-1* pareció ser mayor que en animales del grupo V/Hi-, si bien estas diferencias no fueron significativas. La infección por HiNT no modificó la expresión de *sirt-1* en pulmones V/Hi+, si bien fue menor en animales E/Hi+ que en el grupo E/Hi- a 24 hpi ($p < 0.05$) (**Figura 39D**).

En resumen, la infección por HiNT aumenta la expresión de los marcadores inflamatorios KC y TNF- α , y reduce la expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-12, de los reguladores Nrf2 y Sirt-1, independientemente del estado fisiológico del pulmón.

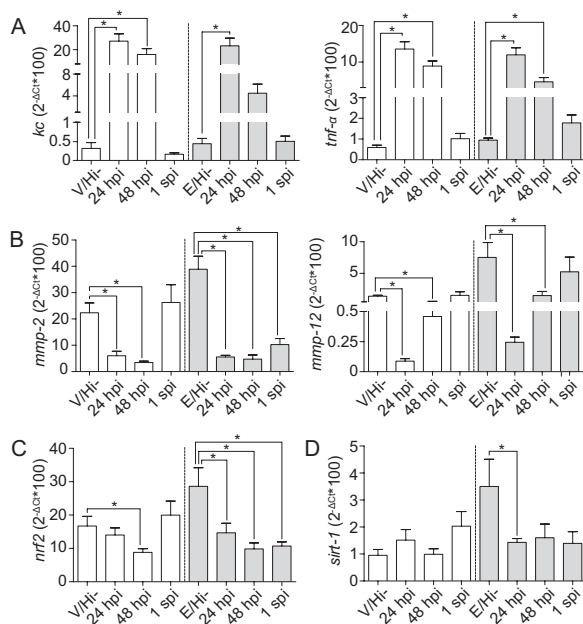


Figura 39. La infección por HiNT modula la expresión de genes en el pulmón murino. Se analizaron marcadores inflamatorios, *kc* y *tnf- α* (**A**); metaloproteasas, *mmp-2* y *mmp-12* (**B**); *nrf2* (**C**); y *sirt-1* (**D**) en pulmones de animales tratados con solución vehículo (barras blancas) y EPP (barras grises) no infectados (V/Hi- y E/Hi-, respectivamente), e infectados con Xen21 en fase exponencial y sacrificados a 24 y 48 hpi, y a 1 spi. Comparación estadística, *t*-test de dos colas (*diferencias significativas).

3.4.7. Modelado *in vivo* de la exacerbación frecuente de naturaleza bacteriana en el pulmón enfisematoso

Las infecciones recurrentes contribuyen a la progresión de la EPOC (Sethi & Murphy, 2001; Sethi et al., 2002; Sethi & Murphy, 2008; Sethi et al., 2008), si bien este importante aspecto de la patología pulmonar no ha sido modelado ni caracterizado *in vivo*. Por ello, evolucionamos el modelo de enfisema pulmonar por instilación de EPP e infección respiratoria por HiNT presentado

en las secciones previas hacia un modelo de exacerbación recurrente, mediante generación de la lesión, infección, recuperación de parámetros inflamatorios post-infección y reinfección. Para ello, los animales fueron: (i) instilados con EPP o solución vehículo (día -24); (ii) infectados intratraquealmente con Xen21 17 días después de la instilación de EPP o vehículo (Infección 1, día -7), e (iii) infectados de la misma forma 7 días después de la Infección 1 (Infección 2, día 0). Los animales fueron sacrificados a 24, 48, 72 y 96 hpi, para determinación de carga bacteriana pulmonar. El estado pulmonar fue evaluado mediante PFV y micro-CT a 24, 48 hpi y a 1, 2, 3, 6, 9 y 12 spi (Figura 32, sección 3.3.9).

La carga pulmonar de E/Hi+ a 48 y 72 hpi fue mayor que la obtenida en V/Hi+ (48 hpi, $p < 0.0001$; 72 hpi, $p < 0.005$). Además, la dinámica de eliminación de la infección bacteriana difirió entre grupos: en animales V/Hi+, la carga bacteriana fue prácticamente eliminada a 48 hpi, siendo comparable a 48, 72 y 96 hpi, y menor a la detectada a 24 hpi (48 hpi, $p < 0.001$; 72 hpi, $p < 0.001$; 96 hpi, $p < 0.005$); por el contrario, en animales E/Hi+, la carga fue comparable a 24, 48 y 72 hpi, y menor sólo a 96 hpi ($p < 0.05$) (Figura 40).

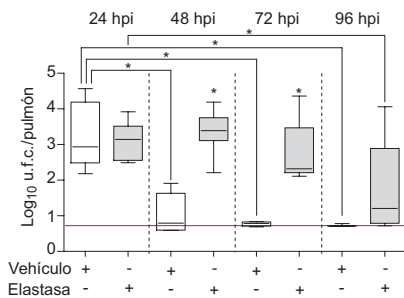


Figura 40. La lesión enfisematosa favorece la reinfección pulmonar por HiNT. Ratones CD1 fueron tratados con solución vehículo o EPP (Día -24), e infectados intratraquealmente (Día -7, Infección 1; Día 0, Infección 2) con Xen 21 (ver Figura 32). La carga pulmonar en E/Hi+ fue mayor que en V/Hi+ a 48 y 72 hpi. Los animales V/Hi+ eliminaron la infección a 48 hpi, mientras que en animales E/Hi+ la infección se mantuvo hasta 96 hpi. Los datos se expresan como media ± DE de log₁₀ u.f.c./pulmón. Línea roja, límite de detección del experimento. Comparación estadística, *t-test* de dos colas (*diferencias significativas).

Las PFV de animales V/Hi+ mostraron menor C (24 hpi, 1 y 3 spi, $p < 0.05$; 48 hpi, $p < 0.001$; 2 spi, $p < 0.01$), mayor R ($p < 0.001$) hasta 6 spi, y mayor E hasta 3 spi (24 hpi, 1 y 3 spi, $p < 0.01$; 48 hpi y 2 spi, $p < 0.01$) que los animales V/Hi-. A 9 spi, los valores de PFV recuperaron los niveles control (Figura 41A). En imágenes de micro-CT de animales V/Hi+, el infiltrado inflamatorio apareció a 24 hpi y alcanzó el pico a 48 hpi; el descenso de los signos inflamatorios se observó a 1 spi, si bien se mantuvieron hasta las 6 spi; y, la recuperación

pulmonar ocurrió a 9 spi, coincidiendo con los PFV (**Figura 41B**). Las PFV de animales E/Hi+, presentaron menor C ($p<0.001$), mayor R (48 hpi, 1, 6 y 9 spi, $p<0.001$; 2 y 3 spi, $p<0.01$), y mayor E (24 y 48 hpi, y 6 spi, $p<0.01$; 1 spi, $p<0.001$, 9 spi, $p<0.05$) que los animales E/Hi-. La recuperación a valores basales ocurrió a 12 spi (**Figura 41C**). Las imágenes de micro-CT mostraron signos inflamatorios a 24 y 48 hpi, que se redujeron a 1 spi; se mantuvieron hasta 9 spi; y, recuperaron a 12 spi (**Figura 41D**).

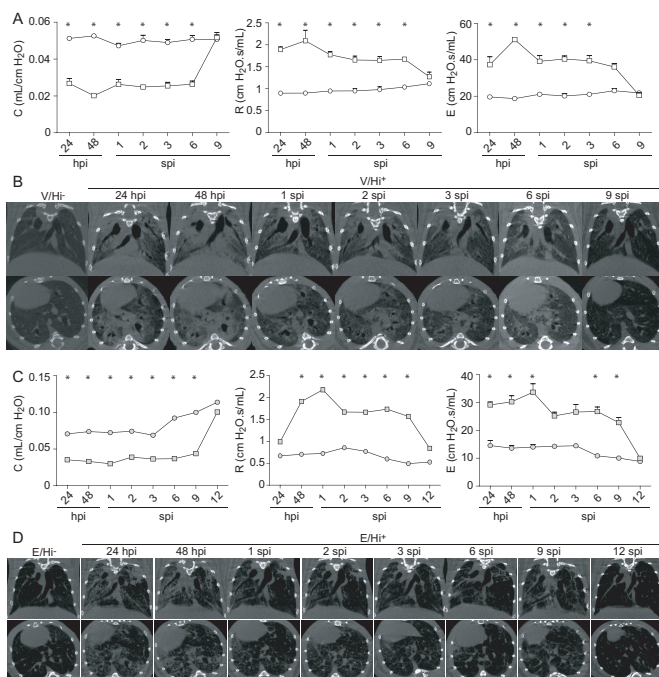


Figura 41. Caracterización de un modelo de exacerbación recurrente por infección bacteriana aguda: dinámica de PFV e imagen micro-CT. Ratones CD1 fueron infectados con Xen21 en los días -7 y 0, 17 y 24 días después de la instilación de EPP o solución vehículo, respectivamente (ver **Figura 32**). Las PFV fueron realizadas en todos los animales previo a la adquisición de imágenes micro-CT. **(A)** Los ratones V/Hi+ (cuadrado) presentaron menor complianza (C, panel izquierdo), mayor resistencia (R, panel central) y elastancia (E, panel derecho) que los V/Hi- (círculo). La alteración de las PFV se detectó hasta 6 spi. Los valores se muestran como media \pm DE. Comparación estadística ANOVA de dos colas (prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni) (*diferencias significativas). **(B)** Imágenes representativas de micro-CT de V/Hi- (izquierda), y V/Hi+, a 24 y 48 hpi, y a 1, 2, 3, 6 y 9 spi (derecha); cortes longitudinales (superior) y transversales (inferior). **(C)** Los ratones E/Hi+ (cuadrado) presentan menor C (panel izquierdo) y mayor R (panel central) y E (panel derecho) que los ratones del grupo E/Hi- (círculo). La alteración de los parámetros se observó hasta 9 spi. Los valores se muestran como media \pm DE, comparación estadística ANOVA de dos colas (prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni) (*diferencias significativas). **(D)** Imágenes representativas de micro-CT de E/Hi- (izquierda) y E/Hi+ a 24 y 48 hpi, y a 1, 2, 3, 6, 9 y 12 spi (derecha); cortes longitudinales (superior) y transversales (inferior).

3.4.8. Escrutinio *in vivo* de factores de virulencia de HiNT

Para identificar genes de *H. influenzae* implicados en la infección pulmonar, sometimos a escrutinio una genoteca de mutantes de la cepa RdKW20 generada por transposición *in vitro*, mediante infección respiratoria de ratones CD1 con función pulmonar normal o enfisema, e identificación de genes de virulencia mediante Tn-seq (**Figura 33, sección 3.3.10.2**). Este método de escrutinio monitoriza el papel relativo de cada gen del genoma de HiNT en el *fitness* necesario para la infección pulmonar murina (Gawronski et al., 2009; Wong et al., 2013). La identificación génica se basó en la disminución de la abundancia relativa de mutantes de cada gen no esencial de la genoteca pre- (*input*) y post-selección (*output*). La genoteca se generó en *H. influenzae* RdKW20 utilizando el transposón *MarinerT7*, cuyas secuencias invertidas contienen la diana de la enzima de restricción *MmeI* (**Figura 33A, sección 3.3.10.2**). Esta genoteca fue utilizada para infección intranasal de ratones CD1, 17 días después de la instilación de EPP o solución vehículo, los animales se sacrificaron a 12 y 24 hpi (**Figura 33B-D, sección 3.3.10.2**). El tamaño de la genoteca fue de ~30.000 mutantes, considerando que el genoma de RdKW20 contiene ~1.724 genes, cada mutante pudo estar representado hasta ~17 veces. La secuenciación Tn-seq de la genoteca *input* (empleada en la infección) reveló la ausencia de 473 genes (~27% del genoma de RdKW20) y la subrepresentación de 42 genes. Estos genes, posiblemente esenciales o necesarios para el óptimo crecimiento *in vitro*, fueron excluidos como putativos genes de virulencia durante el análisis (**Tabla 8 y 9, en gris oscuro**).

La comparación de la genoteca *input* con el *output* recuperado del pulmón de animales a 12 hpi identificó un panel de genes posiblemente importantes en la transición de sBHI (*in vitro*) a pulmón (*in vivo*). En concreto, se identificaron 53 genes: 17 genes implicados en la infección del pulmón instilado con solución vehículo, de los cuales 2 codifican proteínas hipotéticas (HI1595m y HI1462); 36 genes implicados en la infección del pulmón enfisematoso, de los cuales 8 codifican proteínas hipotéticas (HI1444, HI0407, HI0461, HI0523, HI0550, HI1082, HI1086 y HI1084).

La asignación de categorías funcionales de los genes identificados se realizó con apoyo del servidor UniProt (<https://www.uniprot.org>). Seis genes fueron comunes en ambas comparaciones, pertenecientes a las categorías funcionales metabolismo (*guaA*, *pyrG*, *atpD*, *yhxB*) y respuesta a estrés (*relA*, *apaH*); y, por tanto, potencialmente implicados en la infección tanto de pulmón sano como enfisematoso (**Tabla 8 y 9, Figura 42A y 42B**). Los genes implicados específicamente en la infección de animales con función pulmonar normal se agruparon en las categorías funcionales (i) metabolismo (*atpG*, *cysE*), (ii) procesos de transcripción/traducción (*efp*, *tuf*, *ccA*, *genX*), (iii) recombinación (*ruvC*), (iv) respuesta a estrés (*sspA*, *mclA*) (**Tabla 8, Figura 42A y 42B**). Los genes implicados específicamente en la infección de animales con pulmón enfisematoso se agruparon en las categorías funcionales (i) metabolismo (~39%), incluyendo biosíntesis de nucleótidos (*guaB*, *deoD*), aminoácidos (*metG*, *metE*, *serA*, *pheA*, *asnA*, *trpD*, *trpC*, *trpA*), azúcares (*galU*, *galE*, *pfkA*), y ácido fólico (*fold*); (ii) transcripción/traducción (*miaA*); (iii) división celular (*ftsN*); (iv) recombinación (*ruvA*, *xerD*); (v) estrés (*por*); (vi) lipoproteínas y proteínas de superficie (*hel*, *lppB*, respectivamente); (vii) adquisición de nutrientes, zinc (*znuA*) (**Tabla 9, Figura 42A y 42B**). A 24 hpi, se identificó el mismo panel de genes, salvo *mclA* y *sspA* que no fueron identificados en animales con función pulmonar normal; y *fold* y HI0407, no identificados en animales tratados con EPP (**Tabla 8 y 9, Figura 42B**).

Por último, se realizó una comparación entre *outputs* procedentes de animales con función pulmonar normal y enfisema, para identificar posibles factores de virulencia diferenciales entre los dos tipos pulmonares. A 12 hpi, esta comparación identificó 21 genes, en concreto: 15 genes aparecieron implicados en la infección de animales con función pulmonar normal, de los cuales 5 codifican proteínas hipotéticas (HI1571.1, HI0282, HI1493, HI0034, HI0722); 6 genes aparecieron implicados en la infección de animales con enfisema, de los cuales 1 codifica una proteína hipotética (HI1161) (**Tabla 10 y Figura 42C**). Los 10 genes no hipotéticos implicados en la infección de animales con función pulmonar normal se agruparon en las categorías funcionales (i) metabolismo

(de nucleótidos, *gidA*; aminoácidos, *thrB* y *cysE*; ATP, *atpG*; lípidos, *pgpA*; molibdeno, *moaD*), (ii) recombinación (*ruvC*), (iii) respuesta a estrés (*relA*, *sspA*) y (iv) proteasas (*degS*). Los 5 genes no hipotéticos implicados en la infección de animales con enfisema pulmonar se agruparon en las categorías funcionales (i) metabolismo de nitrógeno (*napD*), (ii) estrés (*grpE*), (iii) proteínas de superficie (*lppB*), (iv) virulencia (*mviN*) y (v) proteína de unión a penicilinas (*ponA*). A 24 hpi, esta comparación identificó 7 genes con aparente implicación diferencial durante la infección pulmonar. En concreto, 5 genes aparecieron implicados en la infección de animales con función pulmonar normal (*moaD*, *relA*, *ruvC*, HI1571.1, *degS*) y 2 genes en la infección de animales con pulmón enfisematoso (*napD*, *ponA*) (**Tabla 10 y Figura 42D**).

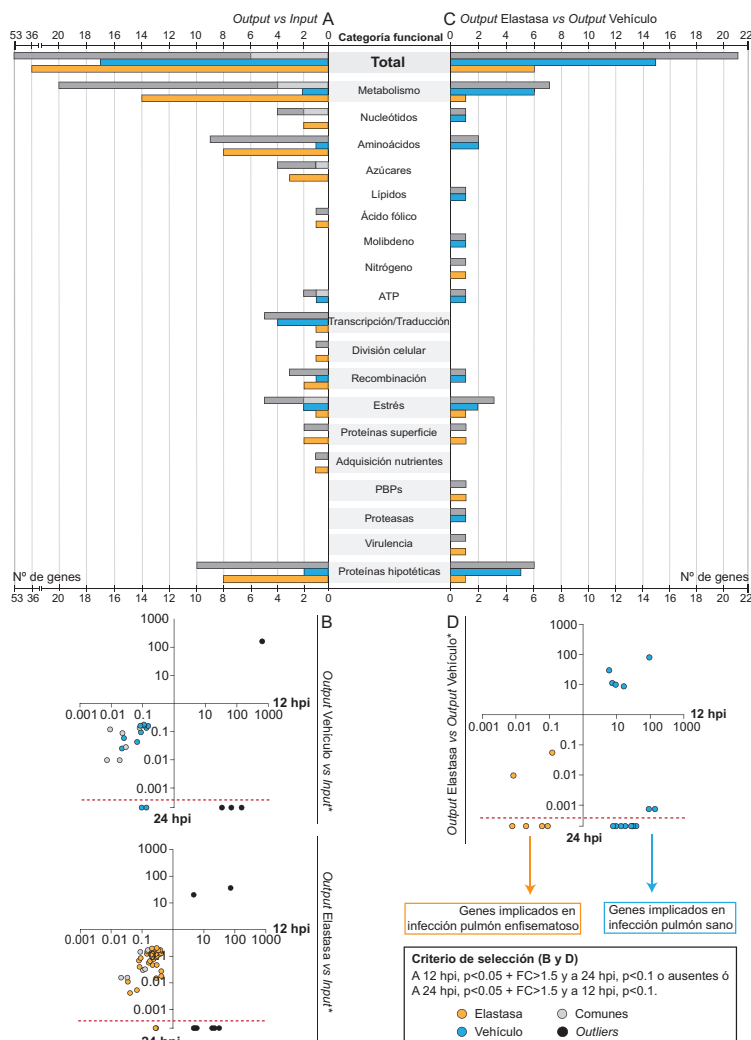


Tabla 8. Genes identificados mediante Tn-seq implicados en infección de pulmón murino con función normal, a 12 y 24 hpi. Datos ordenados en función del valor de la columna FC2.

ID NCBI	Output Solución vehículo 12 hpi- Input vs Output Solución vehículo 24 hpi- Input												Descripción	Categoría funcional	
	12 hpi						24 hpi								
	V ¹	I ²	logFC ³	FC1 ⁵	FC2 ⁴	adj.P.V	V	I	logFC	FC1	FC2	adj.P.V			Gen
H10334	4	575	-7,10	0,01	-137,37	1,6E-09	5,33	520	-6,68	0,01	-102,49	8,3E-12	<i>relA</i>	GTP-Pirofosfomutasa	Estrés
H10222	4	443	-6,77	0,01	-108,90	5,0E-08	49,00	405,6	-3,05	0,12	-8,27	2,1E-02	<i>gnaA</i>	GMP-Sintasa	Metabolismo nucleótidos
H10740	8	453	-5,52	0,02	-54,11	1,3E-06	3,89	416,6	-6,69	0,01	-103,08	9,8E-11	<i>ybcB</i>	Fosfomutasa	Metabolismo azúcares
H10328	2	100	-5,52	0,02	-45,76	7,2E-06	2,33	91,6	-5,31	0,03	-39,66	3,6E-07	<i>gfp</i>	Factor de elongación P	Transcripción/Traducción
H11077	5	227	-5,46	0,02	-44,12	4,0E-06	18,44	207,4	-3,49	0,09	-11,26	1,1E-03	<i>pprG</i>	CTP-Sintasa	Metabolismo nucleótidos
H11606	2	88	-5,31	0,02	-39,54	3,6E-05	4,67	79,8	-4,08	0,06	-16,97	8,3E-05	<i>ccA</i>	ARNt transferasa nucleotidtransferasa	Transcripción/Traducción
H10551	3	97	-5,11	0,03	-34,47	2,8E-05	2,44	88,8	-5,14	0,03	-35,32	3,7E-07	<i>apaH</i>	Tetrafosfatasa diadenosina	Estrés
H10606	4	55	-3,91	0,07	-15,06	2,8E-03	2,11	50,2	-4,53	0,04	-23,16	1,0E-05	<i>cysE</i>	Serin-acetiltransferasa	Metabolismo aminoácidos
H10479	13	169	-3,65	0,08	-12,52	6,8E-03	19,44	144,2	-2,88	0,13	-7,39	2,3E-02	<i>apdD</i>	FOF1 ATP sintasa, subunidad β	Metabolismo ATP
H10314	50	589	-3,56	0,08	-11,83	6,0E-03	85,33	526,6	-2,62	0,16	-6,17	5,4E-02	<i>rivC</i>	Unión Holliday, resolvasa	Recombinación
H10578	21	239	-3,51	0,09	-11,39	1,5E-02	20,89	219,8	-3,40	0,09	-10,52	7,5E-03	<i>tnf</i>	Factor de elongación Tu	Transcripción/Traducción
H11441	2	25	-3,44	0,09	-10,82	1,8E-02	NI ⁶	NI ⁷	ND ⁷	ND	ND	ND	<i>sspA</i>	Proteína A de respuesta estricta	Estrés
H11595m	101	931	-3,20	0,11	-9,20	1,8E-02	146,33	821	-2,49	0,18	-5,61	5,2E-02	<i>fskK</i>	FOF1 ATP sintasa, subunidad γ	Proteína hipotética
H10480	3	27	-3,15	0,11	-8,87	1,9E-02	4,00	24,6	-2,59	0,17	-6,03	2,8E-02	<i>apG</i>	Proteína hipotética	Metabolismo ATP
H11462	4	29	-2,92	0,13	-7,59	3,7E-02	3,56	25,8	-2,88	0,14	-7,37	1,2E-02	-	Proteína reguladora negativa	Proteína hipotética
H10629	2	19	-2,92	0,13	-7,57	3,7E-02	NI	NI	ND	ND	ND	ND	<i>mclA</i>	del factor sigma E	Estrés
H10836	4	26	-2,74	0,15	-6,68	7,2E-02	3,78	24	-2,65	0,16	-6,28	2,4E-02	<i>genX</i>	β-lisina-ligasa, factor de elongación P	Transcripción/Traducción
H10071	112	3	5,06	33,45	33,45	1,5E-02	NI	NI	ND	ND	ND	ND	<i>grpE</i>	Proteína de shock térmico	Estrés
H11161	395	6	6,06	66,60	66,60	3,7E-02	NI	NI	ND	ND	ND	ND	-	Proteína hipotética	Proteína hipotética
H10409	1091	8	7,15	141,70	141,70	6,7E-04	NI	NI	ND	ND	ND	ND	<i>napD</i>	Nitrato reductasa NapD	Metabolismo nitrógeno
H10343	2206	4	9,33	642,34	642,34	3,6E-04	324,11	2	7,33	161,33	161,34	3,3E-04	-	-	-

*Azul, genes sobrerrepresentados en *input* vs *output* solución vehículo; gris claro, genes comunes en las comparaciones *input* vs *output* solución vehículo, e *input* vs *output* elastasa (ver **Tabla 9**); gris oscuro, genes sobrerrepresentados en *output* solución vehículo vs *input* (excluidos de análisis).

¹V, promedio del n° de Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en *output* de animales tratados con solución vehículo.

²I, promedio del n° de Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en *input*.

³logFC=N° Tn-mutantes de *software* Essentials (http://bamics2.embi.ru.nl/websoftware/essentials/essentials_start.php).

⁴FC1=N° Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en *output*.

⁵FC2=N° Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en *output* V/N° Tn-mutantes del gen identificados en I.

⁶NI, No Identificado.

⁷ND, No Determinado.

Tabla 9. Genes identificados mediante Tn-seq implicados en la infección de pulmón murino enfisematoso, a 12 y 24 hpi. Datos ordenados en función del valor de la columna FC2.

ID NCBI	Output Elastasa 12 hpi- Input versus Output Elastasa 24 hpi- Input												Descripción	Categoría funcional
	12 hpi						24 hpi							
E ¹	F ²	logFC ³	FC1 ⁴	FC2 ⁵	adj.P.V	E	I	logFC	FC1	FC2	adj.P.V	Gen		
H10222	11,71	558,4	-5,57	0,02	-47,64	6,1	3,78	-6,00	0,16	-63,80	6,2E-09	<i>gnaA</i>	Metabolismo nucleótidos	
H10740	19,14	570,4	-4,90	0,03	-29,81	6,3	398,8	-5,98	0,16	-63,25	3,5E-09	<i>lysB</i>	Metabolismo azúcares	
H10812	83,43	2411	-4,86	0,03	-28,94	17,5	1616	-6,51	0,11	-91,04	3,5E-10	<i>galU</i>	Metabolismo azúcares	
H10693	28,43	688	-4,60	0,04	-24,31	1,8	444,6	-7,91	0,004	-239,89	2,1E-13	<i>hsl</i>	Proteína superficie	
H10351	2701,4	3969,4	-3,88	0,07	-14,71	14,3	2670,8	-7,54	0,005	-186,34	2,3E-13	<i>galF</i>	Metabolismo azúcares	
H11276	6,71	82,8	-3,65	0,08	-12,59	3,8	55	-3,87	0,068	-14,59	2,9E-04	<i>meiG</i>	Metabolismo aminoácidos	
H10523	418,57	5024,2	-3,59	0,08	-12,01	13,4	3353,4	-4,64	0,040	-25,00	8,8E-06	-	Proteínas tipo-	
H11077	25,14	284,8	-3,51	0,09	-11,37	28,3	194,8	-2,78	0,146	-6,87	1,4E-02	<i>pyrG</i>	Hiposintetasa	
H10221	303,71	3358,2	-3,47	0,09	-11,06	194,8	2280	-3,55	0,085	-11,69	4,5E-02	<i>gnaB</i>	CTP-sintetasa	
H10334	75,57	707	-3,23	0,11	-9,37	14,6	494,6	-5,06	0,030	-33,43	3,0E-07	<i>relA</i>	Inosin 5'-mono-fosfato deshidrogenasa	
H10551	15,43	121,2	-2,99	0,12	-7,96	3	86,4	-4,94	0,033	-30,67	1,5E-06	<i>apaH</i>	GTP-Prolofosfoquinasa	
H10550	581,29	4026,2	-2,79	0,14	-6,93	322,1	2638,6	-3,03	0,122	-8,19	7,1E-03	-	Tetrafosfatasa dinerosina	
H10313	21,43	144,8	-2,76	0,14	-6,79	14,4	95,6	-2,73	0,150	-6,65	2,8E-02	<i>rnaA</i>	Proteína tipo-biosíntesis de LOS	
H10479	30,29	197	-2,70	0,15	-6,51	20,9	121,8	-2,54	0,172	-5,82	4,4E-02	<i>appD</i>	Unión Holliday, ADN Helicasa A, RuvA	
H10703	8,57	51,4	-2,60	0,16	-6,06	2,3	38	-4,14	0,057	-17,66	8,5E-05	<i>lppB</i>	F0F1 ATP sintasa, subunidad β	
H11444	1464,71	8128	-2,47	0,18	-5,55	351,5	5311,8	-3,92	0,066	-15,11	6,1E-04	<i>metF</i>	Lipoproteína B	
H10668	7,14	36,6	-2,35	0,20	-5,10	3	24,2	-3,11	0,115	-8,66	1,1E-02	<i>mtaA</i>	-	
H10982	5,71	26,6	-2,26	0,21	-4,78	4	19	-2,35	0,196	-5,11	7,4E-02	<i>pkA</i>	ARNi delta (2)-isopentenilpifosfato transferasa	
H10465	661,29	3022,8	-2,19	0,22	-4,57	93,7	2025,6	-4,43	0,046	-21,59	4,9E-05	<i>serA</i>	6-fosfofructoquinasa D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa	
H11145	1286,00	5398,4	-2,07	0,24	-4,20	286,3	3650	-3,67	0,078	-12,74	6,6E-04	<i>pkhA</i>	Corismato mutasa/prelenato dehidratasa	
H10564	927,71	3826,2	-2,04	0,24	-4,12	367	2469	-2,75	0,149	-6,72	1,7E-02	<i>asaA</i>	Asparagina sintetasa, AsnA	
H10609	6,14	22,6	-1,87	0,27	-3,65	Ni ⁶	Ni	ND ⁷	ND	ND	NA	<i>folD</i>	5,10-metilen-tetrahidrofolato ciclohidrolasa	
H10309	163,57	591,4	-1,86	0,28	-3,62	46,6	388,8	-3,05	0,120	-8,31	1,1E-02	<i>xerD</i>	Tirosina recombinasa específica de sitio, XerD	
H10407	6,00	21,4	-1,81	0,28	-3,50	Ni	Ni	ND	ND	ND	ND	-	Proteína hipotética	
H10846	169,29	588,2	-1,80	0,29	-3,47	5,6	377,6	-6,06	0,015	-66,52	4,6E-09	<i>por</i>	Oxidoreductasa	
H11086	311,29	1064	-1,77	0,29	-3,42	66,3	734	-3,46	0,091	-11,03	2,4E-04	-	Transportador ABC, permeasa	
H11082	10,00	34,6	-1,75	0,30	-3,36	1,4	24,8	-4,41	0,047	-21,28	1,2E-04	-	Proteína hipotética	
H10461	1534,86	5161,4	-1,75	0,30	-3,36	716,9	3514,6	-2,29	0,204	-4,90	8,2E-02	-	Proteína hipotética	
H10896	219,43	728,2	-1,73	0,30	-3,32	52,7	517,2	-3,29	0,102	-9,77	4,8E-03	<i>ftsN</i>	Proteína de división celular	

H11702	3413,00	10868	-1,67	0,31	-3,18	1,2E-03	1165	7114,8	-2,61	0,164	-6,11	3,3E-02	<i>metE</i>	Metiltrihidropteroil-triglutamato-homocisteína metiltransferasa	Metabolismo aminoácidos
H11084	1653,57	4887	-1,56	0,34	-2,96	1,9E-03	546,2	3284,4	-2,59	0,166	-6,01	4,1E-02	-	Transportador ABC	Proteína hipotética
H11389	1518,57	3944,4	-1,38	0,38	-2,60	6,0E-03	308,4	2551,8	-3,05	0,121	-8,27	8,3E-03	<i>trpD</i>	Fosforilfosfotransferasa	Metabolismo aminoácidos
H11389	3299,71	8453,4	-1,36	0,39	-2,56	4,6E-03	951,7	5553,6	-2,54	0,171	-5,83	4,0E-02	<i>trpC</i>	Fosforilfosfotransferasa	Metabolismo aminoácidos
H11432	1866,14	4463	-1,26	0,42	-2,39	1,6E-02	388,9	3047,8	-2,97	0,128	-7,84	8,6E-03	<i>trpA</i>	Triptófano sintasa, subunidad α	Metabolismo aminoácidos
H10518	1368,86	3271,6	-1,26	0,42	-2,39	1,9E-02	60,5	2203,6	-5,18	0,028	-36,29	4,1E-06	<i>deoD</i>	Parma-nucleosido fosforilasa	Metabolismo nucleótidos
H10119	593,00	1411,8	-1,25	0,42	-2,38	2,8E-02	16,7	931,4	-5,80	0,018	-55,68	1,6E-08	<i>znuA</i>	Transportador de zinc de alta afinidad, proteoma de unión a sustrato	Adquisición de nutrientes
H10310	51,57	11,2	2,23	4,67	4,68	1,4E-02	141	7	4,33	20,13	20,13	7,9E-02	-	Proteína hipotética	Proteína hipotética
H10088	27,29	5,6	2,23	4,69	4,69	2,5E-03	NI	NI	ND	ND	ND	ND	<i>thrB</i>	Homoserina quinasa	Metabolismo aminoácidos
H10282	41,43	8	2,36	5,12	5,12	2,1E-03	NI	NI	ND	ND	ND	ND	-	Asil-CoA tioséter hidrolasa, Yfbb	Proteína hipotética
H10343	24,71	4,2	2,56	5,90	5,91	2,9E-03	NI	NI	ND	ND	ND	ND	<i>napD</i>	Nitrato reductasa NapD, proteoma de ensamblaje	Metabolismo nitrogeno
H10388	22,86	1	4,21	18,55	18,54	1,3E-05	NI	NI	ND	ND	ND	ND	-	Proteína hipotética	Proteína hipotética
H10722	346,29	15,6	4,47	22,16	22,16	4,4E-04	NI	NI	ND	ND	ND	ND	-	Proteína hipotética	Proteína hipotética
H10034	217,14	6,8	4,96	31,12	31,12	2,8E-04	NI	NI	ND	ND	ND	ND	-	Proteína hipotética	Proteína hipotética
H10409	721,71	9,8	6,20	73,43	73,43	3,8E-26	263,9	7	5,18	36,32	36,32	1,6E-02	-	Proteína hipotética	Proteína hipotética

*Azul, genes sobrerrepresentados en *input* vs *output* elastasa; gris claro, genes comunes en las comparaciones *input* vs *output* solución vehículo, e *input* vs *output* elastasa (ver **Tabla 8**); gris oscuro, genes sobrerrepresentados en *output* elastasa vs *input* (excluidos de análisis).

¹E, promedio del nº de Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en *output* de animales tratados con elastasa.

²I, promedio del nº Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en *input*.

³LogFC y FC2, calculados con *software* Essentials (http://bamics2.cmbi.ru.nl/websoftware/essentials/essentials_start.php).

⁴FCI=Nº Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en *output* E/Nº Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en I.

⁵NI, No Identificado.

⁶ND, No Determinado.

Tabla 10. Genes diferencialmente implicados en la infección *in vivo* de pulmón murino con función normal y enfisematoso, a 12 y 24 hpi. Datos ordenados en función del valor de la columna FC2.

ID NCBI	Output Elastasa 12 hpi – Output Vehículo 12 hpi versus Output Elastasa 24 hpi- Output Vehículo 24 hpi										Gen	Descripción	Categoría funcional	
	E ¹	V ²	logFC ³	FC1 ⁴	FC2 ⁵	adj.P.V.	E	V	logFC	FC1				FC2
H11161	3	363	-7,01	0,01	128,49	9,31E-05	NI	NI	ND ⁷	ND	ND	ND	Proteína hipotética	Proteína hipotética
H10343	20	2369	-6,89	0,01	118,58	1,08E-04	2	221	-6,70	0,01	-104,09	7,87E-06	Nitrat reductasa NprD	Metabolismo nitrógeno
H10703	6	290	-5,64	0,02	49,81	2,51E-04	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Lipoproteína B	Proteína de superficie
H10071	6	107	-4,06	0,06	-16,66	6,11E-03	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Proteína de shock térmico	Estrés
H10964	5	52	-3,50	0,09	-11,31	2,71E-02	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Factor de virulencia	Virulencia
H10440	48,7	405,25	-3,05	0,12	-8,29	6,95E-02	12	224	-4,18	0,05	-18,08	1,98E-03	Proteína de unión a penicilina A	Virulencia
H10945	196	32,875	2,58	5,96	5,97	8,97E-02	178	6	4,90	29,89	29,90	1,03E-03	Proteasa	Proteasa
H10314	287	39	2,89	7,43	7,43	3,52E-02	907,9	81,11	3,48	11,19	11,20	6,41E-02	Unión Holliday, resolvasa	Recombinación
H10088	23	3	2,97	7,83	7,83	2,71E-02	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Homoserina quinasa	Metabolismo aminoácidos
H11571,1	486	52	3,23	9,35	9,36	2,71E-02	361,7	36,44	3,31	9,94	9,94	6,86E-02	Proteína hipotética	Proteína hipotética
H10480	27	3	3,27	9,65	9,65	1,75E-02	NI	NI	ND	ND	ND	ND	FOF1 ATP sintasa, subunidad γ	Metabolismo ATP
H10606	48	4	3,75	13,49	13,50	3,16E-03	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Serina acetiltransferasa	Metabolismo aminoácidos
H10334	62	4	4,04	16,40	16,40	6,58E-04	43,3	5,11	3,13	8,73	8,73	6,04E-02	GTP-CoA tiosíter hidrolasa	Estrés
H10282	37	2	4,17	18,02	18,02	8,26E-04	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Acil-CoA tiosíter hidrolasa, YrjB	Proteína hipotética
H10582	174	6	4,75	26,88	26,88	2,31E-04	NI	NI	ND	ND	ND	ND	carboximetilaminometil, proteína de modificación	Metabolismo nucleótidos
H11441	64	2	4,87	29,34	29,34	7,35E-05	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Proteína A de respuesta estricta	Estrés
H11493	36	1	4,95	30,96	30,96	2,19E-04	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Proteína hipotética	Proteína hipotética
H11306	66	2	5,27	38,54	38,54	2,07E-05	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Fosfatidilglicerol fosfatasa A	Metabolismo lípidos
H10034	176	2	6,50	90,78	90,78	4,56E-06	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Proteína hipotética	Proteína hipotética
H11674	131	1	6,55	93,94	93,94	6,70E-08	3,2	2	4,45	21,82	21,82	3,66E-03	Molhidropirina sintetasa, unidad pequeña	Metabolismo molibdeno
H10722	490	4	7,12	138,94	138,94	8,84E-07	NI	NI	ND	ND	ND	ND	Proteína hipotética	Proteína hipotética

* Amarillo, genes sobrerrepresentados en *output* de animales tratados con solución vehículo; azul, genes sobrerrepresentados en *output* de animales tratados con solución vehículo; azul, genes sobrerrepresentados en *output* de animales tratados con solución vehículo.

¹E, promedio del n° de Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en *output* de animales tratados con elastasa.

²V, promedio del n° de Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en *output* de animales tratados con solución vehículo.

³LogFC y FC2, calculados con *software* Essentials (http://bamices2.embi.ru.nl/websoftware/essentials/essentials_start.php).

⁴FC1 = N° Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en *output* E/N° Tn-mutantes de cada gen (columna ID NCBI) identificados en V.

⁵NI, No Identificado.

⁶ND, No Determinado.

Discusión

Los microorganismos han evolucionado una variedad de sistemas especializados en la captación de Fe para superar las restricciones de este elemento esencial durante los procesos infecciosos (Huang & Wilks, 2017). Muchas bacterias Gram negativas (*E. coli* uropatógeno, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Acinetobacter baumannii*), Gram positivas (*S. aureus*), y hongos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) utilizan hemina como fuente de Fe (Carver, 2018). La adquisición de hemina libre o unida a hemoproteínas por parte de los patógenos implica el despliegue de sistemas involucrados en su reconocimiento y/o captación. El **Capítulo 1 de este trabajo de Tesis Doctoral** aborda el caso *H. influenzae*, un patógeno oportunista humano que coloniza las vías respiratorias bajas de pacientes EPOC, donde ocurre un desequilibrio en la homeostasis de Fe. HiNT requiere la presencia de hemina exógena para su respiración aeróbica, no produce sideróforos y presenta un panel amplio de sistemas de captación de Fe-hemina. La inactivación génica y fenotipado realizada mostró una contribución diferencial de los sistemas TbpBA, HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA-DppBCDF, HitABC y PE a la patogénesis de HiNT. Este estudio aborda simultáneamente la actividad de múltiples sistemas de adquisición de Fe-hemina durante la infección por un patógeno bacteriano auxótrofo a hemina, y la relación entre ausencia de Fe, la subversión de la inmunidad innata y la patogénesis respiratoria.

El uso de sistemas modelo de infección pulmonar *in vitro* e *in vivo* reveló el importante papel de HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA-DppBCDF, HitABC y PE durante la infección respiratoria por HiNT, donde TbpBA pareció tener una contribución menor bajo las condiciones empleadas. Los datos obtenidos apoyan el papel de PE como adhesina (Ronander et al., 2008; Ronander et al., 2009). Por otra parte, evidencias previas del aumento de la invasión bacteriana asociada a la inactivación del gen *sapA* podrían estar relacionadas con el uso de epitelio polarizado (Raffel et al., 2013), a diferencia del uso de células no polarizadas (este trabajo). El aumento del ratio de invasión de HiNT375 WT precultivada en sBHI, y el “efecto rescate” de la presencia de hemina exógena en la deficiencia de los mutantes *hxuCBA*, *sapABCDFZ*, *hbpA* y *hpe* durante

la infección epitelial, podrían relacionarse con la subversión de receptores de hemina durante la infección, usando esta molécula unida a modo de ligando. Por ello, el papel de las proteínas de adquisición de hemina HCP1 y HRG1, cuyos niveles están aumentados en células de cáncer de pulmón (Hooda et al., 2013; Latunde-Dada et al., 2006; Rajagopal et al., 2008), en la infección respiratoria por HiNT será evaluado en trabajos futuros. Estudios previos mostraron el papel de HbpA y HxuCBA en un modelo de enfermedad invasiva por HiNT en rata (Morton et al., 2007a; Morton et al., 2009a), y de SapABCDFZ en un modelo de otitis media de chinchilla (Shelton et al., 2011; Vogel et al., 2012). En este trabajo, utilizamos un modelo de infección pulmonar murino expandiendo estas observaciones sobre HbpA, HxuCBA y SapABCDFZ, y proporcionando nuevos papeles *in vivo* para los sistemas HitABC y PE.

Destacamos que HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA-DppBCDF y PE son sistemas multifuncionales que comparten la capacidad para unir hemina. Este trabajo proporciona evidencias sobre la unión de hemina a SapA y HbpA, y sobre la base estructural de dicha interacción. Respecto a HxuA, nuestros análisis estructurales y datos experimentales apoyan la unión de hemina a esta proteína. La hemina unida se almacena, o se dona a células bacterianas vecinas. El uso de RdKW20 para evaluar la donación de hemina entre bacterias representa una limitación potencial de este estudio, realizado en su práctica totalidad con la cepa HiNT375. Reconocemos que RdKW20 es una herramienta útil para generar esta información específica, y desconocemos el motivo de la limitación de HiNT375 para donar hemina, si bien proporcionamos evidencias que sugieren la unión de hemina en la superficie de HiNT375, entre ellas: (i) la disponibilidad de hemina aumentó la infección epitelial por HiNT375, y (ii) la susceptibilidad de HiNT375 a PxE apoya una competencia péptido antimicrobiano:hemina para unirse a SapA (Mason et al., 2011), HxuA o PE. En cuanto a las funciones adicionales, destacamos la relación entre adquisición de Fe y factores antimicrobianos. La inactivación de *sapABCDFZ* y *hbpA* aumentó la susceptibilidad de HiNT a H₂O₂, lo que sugiere que Sap y HbpA pueden contribuir a limitar la toxicidad del exceso de hemina mediante su secuestro en el periplasma bacteriano. Además,

la inactivación de *hxcuABC*, *sapABCDFZ* y *hpe* aumentó la susceptibilidad de HiNT a PxE. Por lo tanto, además del papel ya conocido de SapABCDFZ en la resistencia de HiNT a péptidos antimicrobianos (Mason et al., 2005; Mason, 2006; Shelton et al., 2011), proporcionamos evidencias sobre la contribución de HxcuABC y PE a la subversión de estos elementos de la inmunidad innata soluble. El análisis de la resistencia a péptidos antimicrobianos estuvo motivado por un estudio anterior del grupo de investigación, en el que se realizó un análisis genómico de tres cepas clonales de HiNT aisladas longitudinalmente de muestras de esputo de un paciente con bronquiectasia. Estas cepas mostraron resistencia creciente a péptidos antimicrobianos y polimorfismos en los genes que codifican SapC, HgpB, HgpC, Hup y HxcuC (Garmendia et al., 2014). Por último, cuestionamos si la importación de glutatión podría estar también implicada en la multifuncionalidad de los sistemas en estudio. HbpA fue el único caso, apoyando observaciones previas (Vergauwen et al., 2010). La **Figura 43** resume la multifuncionalidad observada en este trabajo.

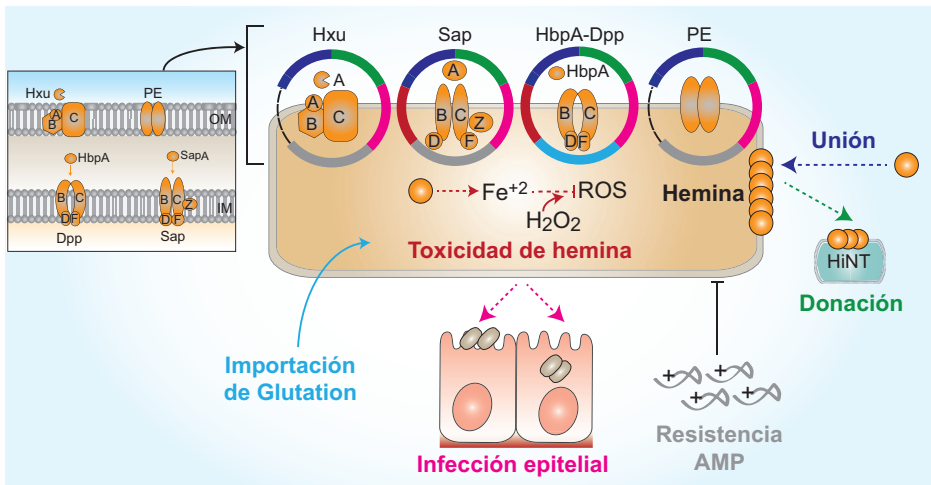


Figura 43. Modelo que muestra la posible multifuncionalidad de cuatro sistemas de adquisición de hemina de HiNT. HxcuABC, SapABCDFZ, HbpA-DppBCDF y PE participan en la unión a- y la donación de hemina entre bacterias, y en la interacción bacteria-célula huésped. Además, HxcuABC juega un papel en la resistencia de HiNT a péptidos antimicrobianos (AMP); SapABCDFZ contribuye a prevenir la toxicidad de la hemina y a la resistencia a AMPs; HbpA participa en la protección frente a toxicidad y en la importación de glutatión; PE participa en resistencia de HiNT a AMPs. SapA y HbpA se localizan en el periplasma; HxcuA y PE se localizan en la membrana externa de HiNT.

Los sistemas de captación de Fe-hemina de HiNT muestran mayor expresión en condiciones de restricción de Fe o hemina; y dicha expresión está regulada, positiva o negativamente, por Fur (Harrison et al., 2005; Whitby et al., 2006). Este trabajo apoya estas observaciones, y las extiende a los genes *sapA* y *hpe*. Además, abordamos una posible red de interconexión entre sistemas a nivel de expresión génica, donde destacamos el papel de HbpA. Durante el crecimiento en sBHI, nuestros resultados son compatibles con la posible activación de HbpA por Fur-Fe²⁺ a través de un mecanismo desconocido (Carpenter et al., 2009; Troxell & Hassan, 2013), lo que a su vez puede relacionarse con una regulación negativa de la expresión de *hxuA*, *sapA*, *hitB* y *hpe*. De hecho, el aumento de expresión de *hxuA*, *sapA* y *hpe* tras la inactivación del gen *hbpA* podría explicar el aumento de resistencia a PxE observado en HiNT375Δ*hbpA* respecto a la cepa WT. Por otro lado, la proteína HbpA puede no estar implicada en la detección de hemina del medio extracelular, ya que HiNT375Δ*hbpA* mostró un perfil de expresión génica similar al de la cepa WT en presencia-ausencia de hemina. En conjunto, la interconexión de los sistemas de adquisición de Fe-hemina puede contribuir a la regulación negativa de la expresión de cada sistema, como un posible mecanismo de prevención de toxicidad.

Las bacterias previenen la toxicidad por el exceso de hemina a través de diferentes mecanismos, incluyendo el procesamiento del anillo de porfirina por la acción catalítica de una hemooxigenasa, y la liberación de Fe²⁺ para su posterior uso. La información genómica de *H. influenzae* indica la presencia de un homólogo del gen *hugZ*, que codifica una hemooxigenasa en *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori* (Guo et al., 2008; Hu et al., 2011), por lo que su papel en la prevención de toxicidad por hemina en HiNT será evaluado en estudios futuros. Por otra parte, hay varios sistemas implicados en adquisición de hemina en HiNT que no han sido considerados en este estudio; en concreto, proteínas que unen hemoglobina-haptoglobina (Hgp), y las proteínas lipoproteína e (P4), HemR y Hup. El genoma de HiNT375 presenta tres genes *hgp* (*hgpB*, *hgpC*, *hgpD*), regulados por variación de fase por un número de repeticiones (CCAA)_n variables en sus respectivas regiones codificantes. De los mismos, el gen

hgpD puede haber sufrido una alteración de su marco de lectura, a diferencia de los genes *hpgB* y *hpgC* y, además, una variación alélica de *hgpB* podría traducirse, generando una proteína carente de los aminoácidos 1 a 30; motivos que complicarían significativamente el análisis de los genes *hgp* de HiNT. Por otra parte, la contribución del gen *hel*, que codifica la lipoproteína e (P4), a la infección epitelial respiratoria, unión a proteínas de la ECM, enfermedad invasiva e infección del oído medio por HiNT ha sido abordada previamente (Morton et al., 2007b; Reidl & Mekalanos, 1996; Su et al., 2016); no es evidente que HemR sea un sistema funcional en HiNT (Hariadi et al., 2015; LaCross et al., 2014); y, Hup no parece contribuir a la infección *in vivo* (Morton et al., 2004).

En resumen, *H. influenzae* ha desarrollado mecanismos redundantes para captar hemina y Fe, y varios de estos sistemas son multifuncionales. Además de la función común de unión-almacenamiento-donación de hemina, HxuCBA está implicado en la infección epitelial y resistencia a péptidos antimicrobianos; SapABCDFZ, en infección epitelial, resistencia a péptidos antimicrobianos, y prevención de toxicidad; HbpA participa en infección epitelial, prevención de toxicidad e importación de glutatión; y PE contribuye a infección epitelial y resistencia a péptidos antimicrobianos. Dado que la inactivación de *hxuCBA*, *sapABCDFZ*, *hbpA* y *hpe* favorece la eliminación bacteriana *in vivo*, es probable que este panel de funciones parcialmente solapadas sea importante para la patogénesis de HiNT. En base a los fenotipos testados, la redundancia funcional parece estar limitada a HxuCBA y PE, a pesar de que HxuCBA es un hemóforo dependiente de TonB (Fournier et al., 2011) y PE un dímero de membrana externa TonB-independiente (Al Jubair et al., 2014). En este trabajo, también abordamos la posible coordinación entre sistemas y la regulación de su expresión en función de la disponibilidad de hemina, y comenzamos a elucidar la existencia de redes regulatorias complejas utilizadas por HiNT para adaptarse al sistema respiratorio del huésped. En términos generales, la modificación farmacológica del metabolismo de Fe-hemina del huésped y/o de los sistemas de transporte de Fe puede ser la clave para desarrollar nuevas estrategias antimicrobianas. Así,

agentes quelantes de Fe con propiedades farmacocinéticas mejoradas podrían convertirse en antimicrobianos interesantes frente a infecciones bacterianas en la era actual, donde el aumento exponencial de las resistencias antibióticas supone un problema para la sanidad pública.

Los agentes antimicrobianos deben ser efectivos, seguros, disponibles y asequibles (Grant et al., 2009). El TxS oral ha sido utilizado extensamente durante años en el tratamiento de otitis media aguda, neumonía y procesos de exacerbación de la EPOC, lo que ha generado un aumento de la resistencia en patógenos respiratorios frecuentes como *H. influenzae*. De hecho, se ha observado un aumento de la resistencia a TxS de aislados clínicos de *H. influenzae* de los serotipos b, e y f, y de cepas no tipificables de diversos orígenes patológicos (Arguedas et al., 2005; Campos et al., 2003; Campos et al., 2003b; Greenhill et al., 2015; Leiberman et al., 2001; Mohd-Zain et al., 2012; Puig et al., 2014; Rowe et al., 2000). En *H. influenzae*, además de cambios en la secuencia y/o expresión de los genes *folH* y *folP*, y adquisición de los genes *sul* (de Groot et al., 1988; de Groot et al., 1996; Enne et al., 2002), la resistencia a TMP se ha relacionado con mutaciones que provocan auxotrofia a timidina/timina (Platt et al., 1983). Los procedimientos estándar para la determinación diagnóstica de la susceptibilidad antibiótica de *H. influenzae* implican el uso del medio MH-F agar que contiene poca timidina, lo que podría subestimar la frecuencia e identificación de cepas resistentes a TMP/TxS. La evaluación de aislados clínicos de HiNT realizada en el **Capítulo 2 de este trabajo de Tesis Doctoral** determinó la existencia de una proporción de aislados formadores de colonias de crecimiento lento en MH-F agar, que nos llevó a evaluar su dependencia a timidina, y a identificar el aislado auxótrofo a timidina HiNT8233. En comparación con $\text{ThyA}_{\text{RdKW20}}$, $\text{ThyA}_{\text{HiNT8233}}$ tiene una inserción de dos aminoácidos en las posiciones 90 y 91, lo que modifica ligeramente su predicción estructural (**Figura 24**). Se han identificado alelos inactivos del gen *thyA* en *S. aureus* debido a deleciones que resultan en modificaciones en el marco de lectura, a polimorfismos que resultan en transiciones de aminoácidos, o a mutaciones sin sentido (Chatterjee et al., 2008; Kriegeskorte et al., 2014). En este trabajo, mostramos que la cepa HINT8233

contiene un alelo del gen *thyA* con una inserción de 6 nucleótidos que conserva el marco de lectura, si bien no podemos excluir una posible alteración de su actividad enzimática. El triptófano (W83), propuesto como sitio activo canónico de ThyA (Baugh et al., 2013), se conserva en ThyA_{HiNT8233}, y trabajos futuros abordarán la purificación de ThyA_{HiNT8233} para evaluar su actividad timidilato sintetasa.

Además, observamos que la auxotrofia a timidina de HiNT8233 es reversible, y dicha reversión se asoció con la desaparición de la inserción en *thyA*_{HiNT8233}. Siguiendo observaciones previas (Platt et al., 1983), la auxotrofia a timidina como fenómeno reversible puede contribuir al aislamiento infrecuente de cepas de HiNT dependientes de timidina en muestras respiratorias. Sin embargo, la resistencia a TxS y TMP se mantuvo inalterable en HiNT8233, independientemente de la reversión. La identificación previa de una mayor resistencia a TMP en protótrofos de *H. influenzae* aislados después de la recuperación de auxótrofos a timidina a partir de muestras de esputo expuestas a concentraciones subinhibitorias de TMP, sugiere que la resistencia a TMP podría ser resultado de una mutación supresora (Platt et al., 1983). Los mecanismos subyacentes a la resistencia a TMP/TxS en HiNT8233 son desconocidos, y serán objeto de estudios futuros.

La auxotrofia a timidina como fenómeno reversible ha sido ampliamente descrita en SCV de *S. aureus* dependientes de timidina (Kahl, 2014), e hizo que HiNT8233 fuera inadecuado para el análisis del impacto de la dependencia a timidina en la patogénesis de HiNT. Por esta razón, inactivamos el gen *thyA* en las cepas HiNT375 y RdKW20. Las cepas mutantes Δ *thyA* mostraron alteraciones en morfología, crecimiento, y dependencia de timidina exógena, comparables a las mostradas por aislados timidina-dependientes de *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* o *S. maltophilia* (Anderson et al., 2007; Chatterjee et al., 2008; Kahl et al., 2003; Kahl et al., 2005; Kok et al., 2001). Además, la disrupción del gen *thyA* en HiNT disminuyó la cantidad de ChoP bacteriana, la deposición de C3b, la adhesión e invasión del epitelio respiratorio, y estimuló la secreción de IL-8 por células A549. En algunos casos, se observaron diferencias

fenotípicas entre los mutantes *thyA* de HiNT375 y RdKW20, probablemente relacionadas con la heterogeneidad genómica asociada a HiNT (De Chiara et al., 2014; Garmendia et al., 2014; Moleres et al., 2018; Pettigrew et al., 2018). En conjunto, es probable que los fenotipos observados *in vitro*, incluyendo la interacción deficiente con epitelio respiratorio y el aumento de su respuesta inflamatoria tras infección por HiNT375 Δ *thyA*, contribuyan a la atenuación de este mutante durante la infección pulmonar murina. De hecho, existen también modificaciones en la biología de la infección de cepas timidina-dependientes de otros patógenos bacterianos como *S. aureus*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri* o *Vibrio cholerae* (Attridge, 1995; Cersini et al., 1998; Kok, 2001; Kriegeskorte et al., 2014).

Por otra parte, la falta de complementación genética es una limitación de este estudio, si bien propusimos varias estrategias de complementación sin éxito (complementación del gen *thyA*_{RdKW20} codificado por plásmido en RdKW20 Δ *thyA*, y la expresión heteróloga codificada por plásmido del alelo *thyA*_{HiNT8233} en RdKW20 Δ *thyA*). A pesar de esta limitación, hemos excluido la existencia de una relación entre los fenotipos asociados a la inactivación del gen *thyA* y cambios en la expresión del gen localizado inmediatamente aguas abajo, homólogo al gen *tadA*, que codifica una adenosina desaminasa específica de ARNt y cuya sobreexpresión confiere resistencia al producto natural bactericida xantorizol en *E. coli* (Yogiara et al., 2015) (datos no mostrados). La adición de timidina exógena restauró parcial o totalmente los fenotipos analizados *in vitro*, pero no la atenuación de HiNT375 Δ *thyA* *in vivo* al infectar con bacterias precrecidas en presencia de timidina, lo que quizá podría estar relacionado con la concentración de timidina del medio.

Además del efecto provocado por la inactivación del gen *thyA* en la virulencia de HiNT, este trabajo muestra que la resistencia a TxS aumenta en cepas mutantes Δ *thyA*. La alteración del gen *thyA* se ha relacionado con mayor resistencia a TMP en otras bacterias (Song et al., 2016). De hecho, la CMI de TMP fue de 1 y >32 μ g/ml, en HiNT375 WT y Δ *thyA*, respectivamente; y de 0.75 y >32 μ g/ml, en RdKW20 WT y Δ *thyA*, respectivamente. HiNT375 Δ *thyA* precrecido

en chocolate + Thy se eliminó más rápidamente en ratones tratados con TxS que en animales no tratados. Aunque pretendimos restaurar la sobreexpresión de *nupC* en las cepas con *thyA* inactivado, el precrecimiento del mutante en sBHI + timidina amplificó aún más la expresión de *nupC*, en comparación con sBHI. Cabe señalar que el aumento de expresión de *nupC* por un mutante *thyA* en *S. aureus* se restauró mediante complementación con *thyA* (Chatterjee et al., 2008). Nuestra observación fue inesperada y no comparable a la de *S. aureus*, y podría asociarse con la falta de inhibición de crecimiento alrededor de discos de TxS observada en las cepas $\Delta thyA$ precrecidas en chocolate + Thy, lo que sugiere que la captación de timidina extracelular por el transportador de nucleósidos NupC podría contribuir a eludir los efectos de TxS en la biosíntesis de timidilato *de novo* en HiNT. En este trabajo, sugerimos que NupC podría funcionar como transportador primario de timidina en HiNT si la síntesis *de novo* de timidilato está bloqueada. La búsqueda genómica no reveló la presencia de transportadores de nucleósidos adicionales en esta especie bacteriana. Para apoyar el papel propuesto para NupC, intentamos sin éxito generar una cepa doble mutante HiNT $\Delta thyA \Delta nupC$ (datos no mostrados).

A continuación, discutimos tres aspectos adicionales de esta parte del trabajo. En primer lugar, las SCV timidina-dependientes de *S. aureus* crecen en agar sangre Columbia (Kriegeskorte et al., 2014); las SCV timidina-dependientes de *S. maltophilia* crecen en agar sangre de oveja (Anderson et al., 2007), pero no crecen en agar MacConkey y medio mínimo M9 (Anderson et al., 2007); en *S. typhimurium*, los mutantes $\Delta thyA$ no crecen en LB agar (Kok et al., 2001). Nuestros resultados muestran que los auxotrófos HiNT $\Delta thyA$ crecen generando colonias de tamaño normal en agar chocolate y sBHI agar, pero no crecen en MH-F agar. Por tanto, no consideramos el término SCV timidina-dependiente para *H. influenzae*. En segundo lugar, las SCV de *S. aureus* se recuperan de muestras clínicas, y son una subpoblación dinámica optimizada para la persistencia que permite a esta bacteria localizarse intracelularmente evitando una respuesta inflamatoria aguda (Kahl, 2014; Kahl et al, 2016). Esto es poco probable en el caso de los mutantes HiNT $\Delta thyA$, ya que presentan alteraciones

significativas en la invasión epitelial. En tercer lugar, este trabajo no aborda la inducción de auxotrofia a timidina en presencia de TxS, por lo que no podemos relacionar directamente la selección de auxótrofos y la resistencia a TxS por exposición antibiótica prolongada. No existen conexiones significativas entre el uso geográfico de TxS y la resistencia de *H. influenzae* a este antibiótico (Karpanoja et al., 2008). Además, no podemos obviar la posible aparición de mutaciones en *thyA* como consecuencia del tratamiento con otros antibióticos con actividad mutagénica como es el ciprofloxacino, que aumenta la resistencia a TMP de forma concomitante (Song et al., 2016). En conjunto, la resistencia a TxS en respuesta a la exposición antibiótica necesita análisis adicionales y monitorización continua.

En conclusión, este trabajo presenta el impacto de la auxotrofia a timidina por inactivación del gen *thyA*, que codifica la timidilato sintetasa ThyA, en la morfología de *H. influenzae* y su interacción con las vías aéreas del huésped e, indirectamente, en su resistencia a TxS. Además, NupC es un potencial facilitador de captación de timidina externa ante la inhibición de la síntesis de timidilato *de novo*. La auxotrofia a timidina reduce la virulencia HiNT, pero también proporciona una ventaja frente a la administración terapéutica de TxS. Por tanto, estos resultados deberían considerarse al evaluar las consecuencias de la administración clínica de TxS. Estudios posteriores deberán evaluar la aparición de auxótrofos a timidina de HiNT en muestras clínicas evitando la probable subestimación actual, y elucidar si la dependencia de timidina se genera como respuesta al tratamiento antibiótico, constituyendo así una ventaja para la supervivencia de HiNT en determinados nichos.

Existen dos manifestaciones clínicas principales de EPOC, bronquitis crónica y enfisema; si bien, la mayoría de los pacientes desarrollan una combinación de ambas (Barnes et al., 2015). La administración de EPP en ratón induce enfisema pulmonar, pero no otras características de la enfermedad como son la hipersecreción mucosa y la fibrosis de las vías aéreas, limitando así su robustez (Jones et al., 2017). Sin embargo, se trata de un modelo de manejo relativamente sencillo y reproducible. Trabajo previo del grupo de investigación evaluó la

infección respiratoria por HiNT en ratones C57BL/6 por su susceptibilidad, empleados en un modelo de exposición subcrónica o crónica a humo de tabaco (Perez-Rial et al., 2011), pero el grado y reproducibilidad de la infección fueron muy deficientes (datos no mostrados). Considerando estos aspectos, el **Capítulo 3 de este trabajo de Tesis Doctoral** presenta una caracterización dual y multinivel de un modelo de infección por *H. influenzae* de un pulmón enfisematoso, como modelo experimental de enfisema y exacerbación infecciosa *in vivo* asociados a EPOC. La inducción de lesión enfisematosa fue confirmada y analizada mediante histología, micro-CT y PFV, con resultados compatibles con estudios previos (Artaechevarria et al., 2010; Artaechevarria et al., 2011). La infección respiratoria se realizó con la cepa *H. influenzae* Xen21, cuyo comportamiento fue comparable a la cepa RdKW20 a todos los efectos testados. Para maximizar nuestras observaciones, realizamos varias modificaciones en el protocolo previamente utilizado en el grupo de investigación (Euba et al., 2015b; Euba et al., 2015c; Euba et al., 2017; Fernandez-Calvet et al., 2018; Morey et al., 2013; Rodriguez-Arce et al., 2017), consistentes en el empleo de bacterias crecidas en fase exponencial e infección mediante administración intratraqueal del inóculo bacteriano. Este segundo aspecto resultó ser crucial para la detección pulmonar de luminiscencia bacteriana, si bien la vía intranasal es nuestra ruta de infección de referencia, por asemejarse más a una infección bacteriana por inhalación. Otro aspecto diferencial fue la imposibilidad de recuperar de forma reproducible muestras de LBA de pulmones tratados con EPP, probablemente por los cambios tisulares asociados a la lesión. La carga bacteriana mostró números consistentemente mayores en pulmón enfisematoso que en pulmón con función normal, si bien estas diferencias no fueron significativas, a diferencia de lo reportado previamente (Pang et al., 2008), lo que podría relacionarse con la raza de ratón empleada: CD1 vs C57BL/6 (Pang et al., 2008). En todos los casos, observamos un claro desacoplamiento entre la emisión de luminiscencia, que desaparece a 24 hpi y requirió tiempos de exposición prolongados, y la carga bacteriana, detectable hasta 48 hpi. Esta observación puede estar relacionada con la dispersión bacteriana en el tejido, quedando por debajo del límite de detección del equipo (PhotonImager Optima), o con la ausencia de replicación

bacteriana durante el proceso infeccioso en el modelo empleado, que puede derivar en un estado metabólico limitante para la emisión de luminiscencia.

Por otra parte, el análisis de parámetros pulmonares asociados a la lesión enfisematosa y la infección por *H. influenzae* se realizó mediante PFV, micro-CT e histología a lo largo del tiempo. La infección indujo un descenso de la complianza y un aumento de la resistencia y elastancia, independientemente del estado fisiológico del pulmón. Estos resultados son compatibles con un proceso inflamatorio, que compromete la expansión pulmonar y aumenta la resistencia al paso del aire, disminuyendo la capacidad pulmonar. Observamos un aumento de la opacidad pulmonar en las imágenes de micro-CT, compatible con un proceso neumónico. Asimismo, observamos cierto desacoplamiento temporal entre carga bacteriana, mayor a 24 hpi, y proceso inflamatorio, más acusado a 48 hpi. La recuperación pulmonar tras la infección en animales con función pulmonar normal ocurrió a 1 spi, mientras que se retrasó hasta las 2-3 spi en animales con pulmón enfisematoso, lo que podría relacionarse con una alteración de las defensas pulmonares y respuesta inflamatoria aberrante como consecuencia de la lesión pulmonar. Respecto al análisis histológico de poblaciones celulares, el pulmón enfisematoso presentó mayor número de macrófagos alveolares, como ha sido descrito en el pulmón EPOC (Barnes, 2014; Barnes et al., 2015; Barnes, 2016), confirmando el desarrollo de inflamación pulmonar asociada a la actividad enzimática de la EPP. La infección por *H. influenzae* favoreció el reclutamiento de macrófagos alveolares y PMN, independientemente del estado fisiológico pulmonar, como ha sido descrito previamente (Rodríguez-Arce et al., 2017), y la infección por HiNT estimuló la expresión de *tnf- α* y *kc*, coincidiendo con (Ganesan et al., 2014), con niveles comparables en el pulmón sano y el pulmón enfisematoso.

El elevado número de macrófagos alveolares en el pulmón EPOC, se relaciona con un incremento de MMP-12, que contribuye directamente a la generación de enfisema (Belvisi & Bottomley, 2003; Hendrix & Kheradmand, 2017). Comparable con estas observaciones, nuestros resultados muestran un incremento en la expresión de *mmp-12* en animales no infectados tratados con

EPP respecto a los animales instilados con solución vehículo; sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. Además, en estadios iniciales de neumonías de origen bacteriano, particularmente por *S. pneumoniae*, la sobreexpresión de *mmp-2* y *mmp-9*, se relaciona con la estimulación de gradientes quimiotácticos sobre células inflamatorias, lo que favorece la eliminación de la infección (Park et al., 2015). Sin embargo, la infección pulmonar por HiNT (24 y 48 hpi) generó un descenso en la expresión de los genes *mmp-2* y *mmp-12*. A 1 spi, los niveles de MMP-2 de animales E/Hi+ se mantuvieron por debajo de los niveles de E/Hi-, lo que podría comprometer la eliminación de la infección pulmonar por HiNT. Debido al papel conjunto de MMP-2 y MMP-9 en la eliminación de la infección bacteriana (Park et al., 2015), la monitorización de la expresión de *mmp-9* será considerada en futuros estudios, hipotetizando que HiNT puede modular la expresión de estas metaloproteasas como mecanismo de evasión de la respuesta inmune pulmonar. Por otra parte, los macrófagos alveolares del pulmón EPOC presentan defectos en la fagocitosis de patógenos respiratorios como *S. pneumoniae* y HiNT (Bewley et al., 2018), lo que pueden aumentar la frecuencia de exacerbaciones y el aislamiento de bacterias en las vías respiratorias bajas. Esta deficiencia se ha relacionado con una disminución de la expresión de genes implicados en opsonofagocitosis que incluyen, entre otros, genes regulados por Nrf2 (Bewley et al., 2018; Reddy et al., 2009). Nuestros resultados muestran un descenso en la expresión de *nrf2* en pulmón enfisematoso infectado por HiNT, sin recuperación a 1 spi, lo que podría favorecer la persistencia de HiNT en las vías aéreas. El efecto de la infección por este patógeno en los genes del regulón Nrf2 será evaluado en futuros estudios. Finalmente, el descenso de la expresión de *sirt-1* se relaciona con una menor autofagia durante la infección por *S. typhimurium* (Ganesan et al., 2017), y con una mayor respuesta inflamatoria por activación de NFκB durante la infección por *P. aeruginosa* (Liu et al., 2017). En este trabajo, la infección por HiNT en el pulmón enfisematoso redujo la expresión de *sirt-1*, lo que podría modular la infección bacteriana y la inflamación pulmonar.

Un aspecto destacable del trabajo realizado en el Capítulo 3 es la evolución

del modelo de infección aguda de pulmón enfisematoso hacia un modelo de exacerbador recurrente. Elegimos el tiempo 1 spi para realizar la segunda infección pulmonar por HiNT porque en este momento ambos modelos pulmonares (función normal y enfisema) presentaron características distintas en cuanto a su recuperación tras la primera infección (ver **Figura 38**). En este caso, la carga bacteriana fue mayor y se mantuvo por más tiempo en el pulmón con enfisema que con función pulmonar normal. Las PFV y micro-CT mostraron el mismo patrón de alteraciones que tras la primera infección, si bien la recuperación pulmonar se retrasó en animales con función pulmonar normal a 9 spi y, en animales con enfisema a 12 spi. Estos resultados sugieren un efecto sinérgico de lesión pulmonar y reinfección, y constituyen una evidencia experimental de la hipótesis del círculo vicioso (ver **Figura 4**) (Mammen & Sethi, 2016; Sze et al., 2012).

Existen evidencias de escrutinios genéticos para identificar factores de virulencia de HiNT *in vivo* en modelos de bacteriemia, otitis media y neumonía en pulmón sano (Gawronski et al., 2009; Herbert et al., 2002; Mason et al., 2003; Wong et al., 2013). Nuestro interés en la interacción HiNT-pulmón EPOC nos llevó a realizar un escrutinio *in vivo* en el modelo de enfisema pulmonar caracterizado. En este caso, realizamos una infección intranasal para considerar el efecto de los mecanismos defensivos de las vías aéreas altas en el escrutinio. Un estudio previo presentando el escrutinio de una genoteca de mutantes generados por Tn en un modelo de coinfección pulmonar por HiNT y virus Influenza A, fue utilizado para la validación parcial de nuestros resultados, obteniendo una coincidencia del ~82.4% de genes esenciales para el crecimiento de RdKW20 *in vitro* (no detectados en *input*); y del ~90% de genes no identificados en material recuperado (*output*) tras infección de animales con función pulmonar normal a 24 hpi (Wong et al., 2013). Teniendo en cuenta las diferencias entre el tamaño inicial de la genoteca (30.000, este estudio vs 75.000, (Wong et al., 2013)) y/o la especie de ratón empleada (CD1, este estudio vs C57BL6, (Wong et al., 2013)), los datos obtenidos mediante esta técnica podrían considerarse robustos.

En este trabajo, identificamos 15 genes bacterianos implicados en la

infección del pulmón con función normal, frente a 6 en la infección del pulmón enfisematoso, lo que podría estar relacionado con la adaptación de HiNT al pulmón EPOC (De Chiara et al., 2014; Molerés et al., 2018; Pettigrew et al., 2018). Respecto a los genes implicados en metabolismo, identificamos 6 en la infección de pulmón con función normal (*gidA*, *thrB*, *cysE*, *atpG*, *pgpA* y *moaD*) frente a 1 (*napD*) en pulmón enfisematoso. En relación con la respuesta a estrés, encontramos 2 genes en la infección de pulmón con función normal (*relA* y *sspA*) frente a 1 (*grpE*) en pulmón enfisematoso. Estas observaciones podrían relacionarse con la adaptación diferencial del patógeno a la limitación de nutrientes y/o fuentes de estrés presentes en ambos nichos pulmonares. No se identificaron genes implicados en división celular, quizá porque HiNT es un patógeno humano (Agrawal & Murphy, 2011) y el modelo murino presenta limitaciones intrínsecas. Las serina-proteasas HtrA/DegP son secretadas por los patógenos gastrointestinales humanos *H. pylori* y *C. jejuni*, y escinden la proteína de adhesión celular E-cadherina de las adherencias intercelulares como parte del proceso infeccioso (Abfalter et al., 2016). El pulmón EPOC presenta niveles de E-cadherina menores a los observados en el pulmón de individuos sanos y de fumadores no sintomáticos (Xu et al., 2017), y la infección por HiNT disminuye los niveles de E-cadherina *in vitro*, modificando la integridad de la barrera epitelial (Kaufhold et al., 2017). Ambas observaciones pueden contribuir a la identificación de DegS (38% y 40% de identidad con DegS/HtrA de *H. pylori* y *C. jejuni*, respectivamente), como factor de virulencia de HiNT. Por otro lado, el daño tisular de las vías aéreas EPOC facilita la exposición de las proteínas de ECM a patógenos que interactúan con ellas, como es el caso de HiNT (Barthel et al., 2012; Euba et al., 2015c; Fink et al., 2002; Hallstrom et al., 2006; Hallstrom et al., 2011; Kenjale et al., 2009; Sinha et al., 2012; St Geme, 2002; Su et al., 2016). En este contexto, la lipoproteína E (P4) de HiNT, que interactúa con laminina (Su et al., 2016), fue identificada como gen necesario para la colonización del pulmón enfisematoso pero no del pulmón sano, probablemente relacionado con la exposición de los elementos de la matriz celular como consecuencia de la actividad enzimática de la elastasa; situación similar podría considerarse para la lipoproteína B, codificada por el

gen *lppB*, identificada como factor de virulencia en la infección de pulmón con enfisema. El papel de ambas proteínas de superficie bacteriana en la interacción con los elementos de la ECM será elucidado en trabajos futuros. La validación de los genes identificados en este trabajo como posibles factores de virulencia de HiNT en el pulmón enfisematoso, será realizada mediante la generación de cepas mutantes individuales y su fenotipado *in vitro* e *in vivo*. Dicha validación será el primer paso para la explotación de nuevas dianas terapéuticas en el desarrollo de antimicrobianos frente a la infección pulmonar por HiNT.

Por último, y debido al elevado número de animales utilizados en este estudio, cabe mencionar la consideración y aplicación del criterio de las tres erres de experimentación animal (Reemplazo, Reducción, Refinamiento). Estableciendo el criterio de reducción, cada grupo animal fue utilizado para múltiples fines: de los animales utilizados para cuantificación de carga bacteriana pulmonar, se extrajeron muestras para determinación de ácidos grasos del pulmón, extracción de ARN y análisis de lesiones histopatológicas. Por otro lado, los grupos de animales empleados para determinación de luminiscencia bacteriana fueron utilizados para la determinación de parámetros pulmonares mediante PFV y micro-CT, a lo largo del tiempo. Además, considerando el criterio de refinamiento y la limitada información ofrecida por la luminiscencia bacteriana pulmonar en el modelo de infección de pulmón enfisematoso, esta determinación se excluyó del modelo de reinfección pulmonar, minimizando el número de procedimientos en que los animales fueron anestesiados. La aplicación del criterio de reemplazo absoluto (ausencia de animales) y relativo (sustitución por animales con menor percepción de dolor, como invertebrados), no procedió en este trabajo, puesto que la información ofrecida por el modelo de infección pulmonar murino no es sustituible por modelos computacionales ni especies animales no vertebradas. Sin embargo, cabe mencionar que para la implementación de este estudio se han considerado gran cantidad de factores (cepa bacteriana, tipo de inóculo, vía de administración, tiempos de sacrificio), que no deberán reevaluarse en estudios futuros.

Conclusiones

1. Los sistemas de captación de Fe-hemina de *H. influenzae* HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA-DppBCDF y PE están implicados en la infección por este patógeno oportunista, evaluada mediante el uso de sistemas modelo de infección respiratoria *in vivo* e *in vitro*.

2. La expresión de los genes *hxuA*, *sapA*, *hbpA*, *hpe* y *hitB* es un proceso coordinado, que puede además estar regulado por la disponibilidad de hemina en el medio extracelular. HbpA parece desempeñar un papel prominente en la coordinación de este proceso.

3. HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA-DppBCDF y PE son sistemas implicados en la unión de hemina por *H. influenzae*, así como en la donación de esta fuente de Fe a otras células bacterianas de la misma especie. La unión de hemina a través de estos sistemas contribuye además a la infección del epitelio respiratorio por *H. influenzae*.

4. HxuCBA, SapABCDFZ, HbpA-DppBCDF y PE son sistemas de captación de Fe-hemina multifuncionales cuya participación diferencial en procesos de unión a- y donación de hemina entre bacterias, resistencia a péptidos antimicrobianos, prevención de toxicidad e importe de glutatión contribuye de manera no redundante a la infección respiratoria por HiNT.

5. La inactivación del gen *thyA*, que codifica la timidilato sintetasa ThyA, provoca auxotrofia a timidina en *H. influenzae*, lo que limita el crecimiento bacteriano en medios con concentraciones bajas de timidina y aumenta la resistencia al antibiótico cotrimoxazol.

6. La inactivación del gen *thyA* en *H. influenzae* genera defectos en la morfología y el crecimiento bacterianos, que pueden ser restaurados por la adición de timidina exógena en el medio.

7. La inactivación del gen *thyA* disminuye los niveles de fosforilcolina en la superficie de *H. influenzae*, así como la capacidad de este patógeno para unir factor C3b del sistema de complemento, e infectar epitelio respiratorio humano en cultivo. Estas deficiencias pueden ser restauradas, parcial o totalmente, mediante el crecimiento bacteriano en presencia de timidina exógena.

8. La inactivación del gen *thyA* atenúa la virulencia de *H. influenzae*, si bien también disminuye la eficacia del tratamiento antibiótico con cotrimoxazol *in vivo*.

9. La cepa *H. influenzae* Xen21 presenta dinámicas de crecimiento *in vitro* e infección respiratoria *in vivo* comparables a las de su cepa de referencia *H. influenzae* RdKW20. El empleo de *H. influenzae* Xen21, tras su crecimiento en fase exponencial y administración intratraqueal murina, ofrece una herramienta interesante para monitorizar la dinámica de la infección pulmonar por este patógeno *in vivo*.

10. La instilación intratraqueal de elastasa pancreática porcina induce lesiones compatibles con el desarrollo de un enfisema pulmonar en ratones CD1, tal y como se observa mediante pruebas de función ventilatoria, microtomografía computerizada e histología pulmonar.

11. La inducción de lesión enfisematosa retrasa la recuperación pulmonar tras la infección murina por *H. influenzae*. La exacerbación recurrente de etiología infecciosa tiene efectos más acusados en el pulmón enfisematoso que en el pulmón con función normal, respecto a la carga bacteriana y tiempo necesario para su recuperación fisiológica tras la infección.

12. El escrutinio de factores de virulencia de *H. influenzae* mediante infección pulmonar murina con una genoteca de mutantes generados por transposición e identificación de eventos de transposición mediante Tn-seq, reveló un panel de genes bacterianos necesarios para la infección pulmonar implicados, entre otros, en metabolismo y respuesta a estrés.

Referencias

- Aarbiou, J., Verhoosel, R. M., Van Wetering, S., De Boer, W. I., Van Krieken, J. H., Litvinov, S. V., Rabe, K. F. & Hiemstra, P. S. (2004). Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 30 (2): 193-201. doi: 10.1165/ramb.2002-0267OC.
- Abdel-Rahman, E. M., Ismael, N. A. & Dixon, R. A. (2000). Antibiotic resistance and prevalence of beta-lactamase in *Haemophilus influenzae* isolates-a surveillance study of patients with respiratory infection in Saudi Arabia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 36 (3): 203-8.
- Abfalter, C. M., Schubert, M., Gotz, C., Schmidt, T. P., Posselt, G. & Wessler, S. (2016). HtrA-mediated E-cadherin cleavage is limited to DegP and DegQ homologs expressed by Gram-negative pathogens. *Cell Commun Signal*, 14 (1): 30. doi: 10.1186/s12964-016-0153-y.
- Adhikari, P., Kirby, S. D., Nowalk, A. J., Veraldi, K. L., Schryvers, A. B. & Mietzner, T. A. (1995). Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport operon. *J Biol Chem*, 270 (42): 25142-9.
- Agarwal, A. R., Zhao, L., Sancheti, H., Sundar, I. K., Rahman, I. & Cadenas, E. (2012). Short-term cigarette smoke exposure induces reversible changes in energy metabolism and cellular redox status independent of inflammatory responses in mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303 (10): L889-98. doi: 10.1152/ajplung.00219.2012.
- Agarwal, A. R., Yin, F. & Cadenas, E. (2014). Short-term cigarette smoke exposure leads to metabolic alterations in lung alveolar cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 51 (2): 284-93. doi: 10.1165/ramb.2013-0523OC.
- Agrawal, A. & Murphy, T. F. (2011). *Haemophilus influenzae* infections in the *H. influenzae* type b conjugate vaccine era. *J Clin Microbiol*, 49 (11): 3728-32. doi: 10.1128/JCM.05476-11.
- Ahearn, C. P., Gallo, M. C. & Murphy, T. F. (2017). Insights on persistent airway infection by non-typeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Pathog Dis*, 75 (4). doi: 10.1093/femspd/ftx042.
- Ahmad, S., Ahmad, M., Khan, S., Ahmad, F., Nawaz, S. & Khan, F. U. (2017). An overview on phase variation, mechanisms and roles in bacterial adaptation. *J Pak Med Assoc*, 67 (2): 285-291.
- Ahmad, T., Sundar, I. K., Lerner, C. A., Gerloff, J., Tormos, A. M., Yao, H. & Rahman, I. (2015). Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J*, 29 (7): 2912-29. doi: 10.1096/fj.14-268276.
- Ahren, I. L., Janson, H., Forsgren, A. & Riesbeck, K. (2001a). Protein D expression promotes the adherence and internalization of non-typeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic cells. *Microb Pathog*, 31 (3): 151-8. doi: 10.1006/mpat.2001.0456.
- Ahren, I. L., Williams, D. L., Rice, P. J., Forsgren, A. & Riesbeck, K. (2001b). The importance of a beta-glucan receptor in the nonopsonic entry of nontypeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic and epithelial cells. *J Infect Dis*, 184 (2): 150-8. doi: 10.1086/322016.
- Akerley, B. J. & Lampe, D. J. (2002). Analysis of gene function in bacterial pathogens by GAM-

BIT. *Methods Enzymol*, 358: 100-8.

Akerley, B. J., Rubin, E. J., Novick, V. L., Amaya, K., Judson, N. & Mekalanos, J. J. (2002). A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (2): 966-71. doi: 10.1073/pnas.012602299.

Al Jubair, T., Singh, B., Fleury, C., Blom, A. M., Morgelin, M., Thunnissen, M. M. & Riesbeck, K. (2014). *Haemophilus influenzae* stores and distributes hemin by using protein E. *Int J Med Microbiol*, 304 (5-6): 662-8. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.04.015.

Albert, R. K., Connett, J., Bailey, W. C., Casaburi, R., Cooper, J. A., Jr., Criner, G. J., Curtis, J. L., Dransfield, M. T., Han, M. K., Lazarus, S. C., et al. (2011). Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med*, 365 (8): 689-98. doi: 10.1056/NEJMoa1104623.

Alcorn, J. F. & Wright, J. R. (2004). Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem*, 279 (29): 30871-9. doi: 10.1074/jbc.M400796200.

Ali, M. K., Kim, R. Y., Karim, R., Mayall, J. R., Martin, K. L., Shahandeh, A., Abbasian, F., Starkey, M. R., Loustaud-Ratti, V., Johnstone, D., et al. (2017). Role of iron in the pathogenesis of respiratory disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 88: 181-195. doi: 10.1016/j.biocel.2017.05.003.

Allen, S., Zaleski, A., Johnston, J. W., Gibson, B. W. & Apicella, M. A. (2005). Novel sialic acid transporter of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 73 (9): 5291-300. doi: 10.1128/IAI.73.9.5291-5300.2005.

Amatngalim, G. D., van Wijck, Y., de Mooij-Eijk, Y., Verhoosel, R. M., Harder, J., Lekkerkerker, A. N., Janssen, R. A. & Hiemstra, P. S. (2015). Basal cells contribute to innate immunity of the airway epithelium through production of the antimicrobial protein RNase 7. *J Immunol*, 194 (7): 3340-50. doi: 10.4049/jimmunol.1402169.

Anderson, D. S., Adhikari, P., Nowalk, A. J., Chen, C. Y. & Mietzner, T. A. (2004). The hFbpABC transporter from *Haemophilus influenzae* functions as a binding-protein-dependent ABC transporter with high specificity and affinity for ferric iron. *J Bacteriol*, 186 (18): 6220-9. doi: 10.1128/JB.186.18.6220-6229.2004.

Anderson, D. S., Adhikari, P., Weaver, K. D., Crumbliss, A. L. & Mietzner, T. A. (2007). The *Haemophilus influenzae* hFbpABC Fe³⁺ transporter: analysis of the membrane permease and development of a gallium-based screen for mutants. *J Bacteriol*, 189 (14): 5130-41. doi: 10.1128/JB.00145-07.

Anderson, S. W., Stapp, J. R., Burns, J. L., Qin, X. (2007). Characterization of small-colony-variant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 45 (2): 529-35. doi: 10.1128/JCM.01444-06.

Anto, R. J., Mukhopadhyay, A., Shishodia, S., Gairola, C. G. & Aggarwal, B. B. (2002). Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of IkappaB(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis*, 23 (9): 1511-8.

- Antunes, M. A. & Rocco, P. R. (2011). Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An Acad Bras Cienc*, 83 (4): 1385-96.
- Anzaldi, L. L. & Skaar, E. P. (2010). Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect Immun*, 78 (12): 4977-89. doi: 10.1128/IAI.00613-10.
- Anzueto, A. (2010). Impact of exacerbations on COPD. *Eur Respir Rev*, 19 (116): 113-8. doi: 10.1183/09059180.00002610.
- Arguedas, A., Sierra, H., Soley, C., Guevara, S. & Brilla, E. (2005). Activity of trimethoprim-sulfamethoxazole against middle ear fluid pathogens obtained from Costa Rican children with otitis media. *Pediatr Infect Dis J*, 24 (9): 839-41.
- Artachevarria, X., Blanco, D., Perez-Martin, D., de Biurrun, G., Montuenga, L. M., de Torres, J. P., Zulueta, J. J., Bastarrika, G., Munoz-Barrutia, A. & Ortiz-de-Solorzano, C. (2010). Longitudinal study of a mouse model of chronic pulmonary inflammation using breath hold gated micro-CT. *Eur Radiol*, 20 (11): 2600-8. doi: 10.1007/s00330-010-1853-0.
- Artachevarria, X., Blanco, D., de Biurrun, G., Ceresa, M., Perez-Martin, D., Bastarrika, G., de Torres, J. P., Zulueta, J. J., Montuenga, L. M., Ortiz-de-Solorzano, C., et al. (2011). Evaluation of micro-CT for emphysema assessment in mice: comparison with non-radiological techniques. *Eur Radiol*, 21 (5): 954-62. doi: 10.1007/s00330-010-1982-5.
- Atkinson, R. W., Samoli, E., Analitis, A., Fuller, G. W., Green, D. C., Anderson, H. R., Purdie, E., Dunster, C., Aitlhadj, L., Kelly, F. J., et al. (2016). Short-term associations between particle oxidative potential and daily mortality and hospital admissions in London. *Int J Hyg Environ Health*, 219 (6): 566-72. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.06.004.
- Attridge, S. R. (1995). Thymine auxotrophy as an attenuating marker in *Vibrio cholerae*. *Microb Pathog*, 19 (1): 11-8.
- Auerbach, O., Forman, J. B., Gere, J. B., Kassouny, D. Y., Muehsam, G. E., Petrick, T. G., Smolin, H. J. & Stout, A. P. (1957). Changes in the bronchial epithelium in relation to smoking and cancer of the lung; a report of progress. *N Engl J Med*, 256 (3): 97-104. doi: 10.1056/NEJM195701172560301.
- Avadhanula, V., Rodriguez, C. A., Ulett, G. C., Bakaletz, L. O. & Adderson, E. E. (2006). Non-typeable *Haemophilus influenzae* adheres to intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on respiratory epithelial cells and upregulates ICAM-1 expression. *Infect Immun*, 74 (2): 830-8. doi: 10.1128/IAI.74.2.830-838.2006.
- Baarsma, H. A., Bos, S., Meurs, H., Visser, K. H., Smit, M., Schols, A. M., Langen, R. C., Kerstjens, H. A. & Gosens, R. (2013). Pharmacological inhibition of GSK-3 in a guinea pig model of LPS-induced pulmonary inflammation: I. Effects on lung remodeling and pathology. *Respir Res*, 14: 113. doi: 10.1186/1465-9921-14-113.
- Baddal, B., Muzzi, A., Censini, S., Calogero, R. A., Torricelli, G., Guidotti, S., Taddei, A. R., Covacci, A., Pizza, M., Rappuoli, R., et al. (2015). Dual RNA-seq of nontypeable *Haemophilus influenzae* and host cell transcriptomes reveals novel insights into host-pathogen cross talk. *MBio*,

6 (6): e01765-15. doi: 10.1128/mBio.01765-15.

Bals, R., Wang, X., Zasloff, M. & Wilson, J. M. (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (16): 9541-6.

Bals, R. & Hiemstra, P. S. (2004). Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 23 (2): 327-33.

Barber, M. F. & Elde, N. C. (2015). Buried treasure: evolutionary perspectives on microbial iron piracy. *Trends Genet*, 31 (11): 627-36. doi: 10.1016/j.tig.2015.09.001.

Barberan-Garcia, A., Rodriguez, D. A., Blanco, I., Gea, J., Torralba, Y., Arbillaga-Etxarri, A., Barbera, J. A., Vilaro, J., Roca, J. & Orozco-Levi, M. (2015). Non-anaemic iron deficiency impairs response to pulmonary rehabilitation in COPD. *Respirology*, 20 (7): 1089-95. doi: 10.1111/resp.12591.

Barnes, P. J., Shapiro, S. D. & Pauwels, R. A. (2003). Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*, 22 (4): 672-88.

Barnes, P. J. (2009). The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 41 (6): 631-8. doi: 10.1165/rcmb.2009-0220TR.

Barnes, P. J. (2014). Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*, 35 (1): 71-86. doi: 10.1016/j.ccm.2013.10.004.

Barnes, P. J., Burney, P. G., Silverman, E. K., Celli, B. R., Vestbo, J., Wedzicha, J. A. & Wouters, E. F. (2015). Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*, 1: 15076. doi: 10.1038/nrdp.2015.76.

Barnes, P. J. (2016). Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 138 (1): 16-27. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.011.

Barrett, E. G., Wilder, J. A., March, T. H., Espindola, T. & Bice, D. E. (2002). Cigarette smoke-induced airway hyperresponsiveness is not dependent on elevated immunoglobulin and eosinophilic inflammation in a mouse model of allergic airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 165 (10): 1410-8. doi: 10.1164/rccm.2106029.

Barnett, M. L., Lamb, K. A., Costello, K. M. & Pike, M. C. (1993). Characterization of interleukin-8 receptors in human neutrophil membranes: regulation by guanine nucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 1177 (3): 275-82.

Barthel, D., Singh, B., Riesbeck, K. & Zipfel, P. F. (2012). Haemophilus influenzae uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity. *J Immunol*, 188 (1): 379-85. doi: 10.4049/jimmunol.1101927.

Baugh, L., Gallagher, L. A., Patrapuvich, R., Clifton, M. C., Gardberg, A. S., Edwards, T. E., Armour, B., Begley, D. W., Dieterich, S. H., Dranow, D. M. et al. (2013). Combining functional and structural genomics to sample the essential *Burkholderia* structome. *PLoS One*, 8 (1): e53851.

doi: 10.1371/journal.pone.0053851.

Beckett, E. L., Stevens, R. L., Jarnicki, A. G., Kim, R. Y., Hanish, I., Hansbro, N. G., Deane, A., Keely, S., Horvat, J. C., Yang, M., et al. (2013). A new short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease identifies a role for mast cell tryptase in pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 131 (3): 752-62. doi: 10.1016/j.jaci.2012.11.053.

Beharka, A. A., Gaynor, C. D., Kang, B. K., Voelker, D. R., McCormack, F. X. & Schlesinger, L. S. (2002). Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol*, 169 (7): 3565-73.

Belvisi, M. G. & Bottomley, K. M. (2003). The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res*, 52 (3): 95-100.

Berenson, C. S., Kruzel, R. L., Eberhardt, E., Dolnick, R., Minderman, H., Wallace, P. K. & Sethi, S. (2014). Impaired innate immune alveolar macrophage response and the predilection for COPD exacerbations. *Thorax*, 69 (9): 811-8. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203669.

Berenson, C. S., Kruzel, R. L., Wrona, C. T., Mammen, M. J. & Sethi, S. (2015). Impaired innate COPD alveolar macrophage responses and Toll-Like receptor-9 polymorphisms. *PLoS One*, 10 (9): e0134209. doi: 10.1371/journal.pone.0134209.

Bernhard, W., Hoffmann, S., Dombrowsky, H., Rau, G. A., Kamlage, A., Kappler, M., Haitsma, J. J., Freihorst, J., von der Hardt, H. & Poets, C. F. (2001a). Phosphatidylcholine molecular species in lung surfactant: composition in relation to respiratory rate and lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25 (6): 725-31. doi: 10.1165/ajrcmb.25.6.4616.

Bernhard, W., Postle, A. D., Rau, G. A. & Freihorst, J. (2001b). Pulmonary and gastric surfactants. A comparison of the effect of surface requirements on function and phospholipid composition. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 129 (1): 173-82.

Bernhard, W. (2016). Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology. *Ann Anat*, 208: 146-150. doi: 10.1016/j.aanat.2016.08.003.

Bewley, M. A., Budd, R. C., Ryan, E., Cole, J., Collini, P., Marshall, J., Kolsum, U., Beech, G., Emes, R. D., Tcherniaeva, I., et al. (2018). Opsonic phagocytosis in chronic obstructive pulmonary disease is enhanced by Nrf2 agonists. *Am J Respir Crit Care Med*. doi: 10.1164/rccm.201705-0903OC.

Biancardi, E., Fennell, M., Rawlinson, W. & Thomas, P. S. (2016). Viruses are frequently present as the infecting agent in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease in patients presenting to hospital. *Intern Med J*, 46 (10): 1160-1165. doi: 10.1111/imj.13213.

Bingle, L., Tetley, T. D. & Bingle, C. D. (2001). Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25 (1): 84-91. doi: 10.1165/ajrcmb.25.1.4341.

Blanco, O. & Perez-Gil, J. (2007). Biochemical and pharmacological differences between prepa-

rations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: role of the different components in an efficient pulmonary surfactant. *Eur J Pharmacol*, 568 (1-3): 1-15. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.04.035.

Bolger, M. S., Ross, D. S., Jiang, H., Frank, M. M., Ghio, A. J., Schwartz, D. A. & Wright, J. R. (2007). Complement levels and activity in the normal and LPS-injured lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292 (3): L748-59. doi: 10.1152/ajplung.00127.2006.

Boutou, A. K., Karrar, S., Hopkinson, N. S. & Polkey, M. I. (2013). Anemia and survival in chronic obstructive pulmonary disease: a dichotomous rather than a continuous predictor. *Respiration*, 85 (2): 126-31. doi: 10.1159/000338792.

Bracke, K. R., D'Hulst A, I., Maes, T., Demedts, I. K., Moerloose, K. B., Kuziel, W. A., Joos, G. F. & Brusselle, G. G. (2007). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation, but not airway remodelling, is attenuated in chemokine receptor 5-deficient mice. *Clin Exp Allergy*, 37 (10): 1467-79. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02808.x.

Brandtzaeg, P. (1992). Humoral immune response patterns of human mucosae: induction and relation to bacterial respiratory tract infections. *J Infect Dis*, 165 Suppl 1: S167-76.

Brashier, B. B. & Kodgule, R. (2012). Risk factors and pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Assoc Physicians India*, 60 Suppl: 17-21.

Brass, D. M., Hollingsworth, J. W., Cinque, M., Li, Z., Potts, E., Toloza, E., Foster, W. M. & Schwartz, D. A. (2008). Chronic LPS inhalation causes emphysema-like changes in mouse lung that are associated with apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39 (5): 584-90. doi: 10.1165/rcmb.2007-0448OC.

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3 (3): 238-50. doi: 10.1038/nrmicro1098.

Burgel, P. R. & Nadel, J. A. (2004). Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax*, 59 (11): 992-6. doi: 10.1136/thx.2003.018879.

Burrows, B., Knudson, R. J., Cline, M. G. & Lebowitz, M. D. (1977). Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis*, 115 (2): 195-205. doi: 10.1164/arrd.1977.115.2.195.

Calverley, P. M., Anderson, J. A., Celli, B., Ferguson, G. T., Jenkins, C., Jones, P. W., Yates, J. C., Vestbo, J. & investigators, T. (2007). Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 356 (8): 775-89. doi: 10.1056/NEJMoa063070.

Calverley, P. M., Rabe, K. F., Goehring, U. M., Kristiansen, S., Fabbri, L. M., Martinez, F. J., M & groups, M. s. (2009). Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet*, 374 (9691): 685-94. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61255-1.

Campos, J., Aracil, B., Roman, F. & Perez-Vazquez, M. (2003). Molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b isolated from children with clinical cases of conjugate vaccine

failures. *J Clin Microbiol*, 41 (8): 3915-8.

Campos, J., Roman, F., Perez-Vazquez, M., Oteo, J., Aracil, B. & Cercenado, E. Infections due to *Haemophilus influenzae* serotype E: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Infect Dis*, 37 (6): 841-5. doi: 10.1086/377232.

Cantin, A. M., North, S. L., Hubbard, R. C. & Crystal, R. G. (1987). Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol (1985)*, 63 (1): 152-7. doi: 10.1152/jappl.1987.63.1.152.

Caramori, G., Romagnoli, M., Casolari, P., Bellettato, C., Casoni, G., Boschetto, P., Chung, K. F., Barnes, P. J., Adcock, I. M., Ciaccia, A., et al. (2003). Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax*, 58 (4): 348-51.

Carpenter, B. M., Whitmire, J. M. & Merrell, D. S. (2009). This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis. *Infect Immun*, 77 (7): 2590-601. doi: 10.1128/IAI.00116-09.

Carruthers, M. D., Tracy, E. N., Dickson, A. C., Ganser, K. B., Munson, R. S., Jr. & Bakaletz, L. O. (2012). Biological roles of nontypeable *Haemophilus influenzae* type IV pilus proteins encoded by the pil and com operons. *J Bacteriol*, 194 (8): 1927-33. doi: 10.1128/JB.06540-11.

Carver, P. L. (2018). The battle for iron between humans and microbes. *Curr Med Chem*, 25 (1): 85-96. doi: 10.2174/0929867324666170720110049.

Cassat, J. E. & Skaar, E. P. (2013). Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*, 13 (5): 509-19. doi: 10.1016/j.chom.2013.04.010.

Castaldi, P. J., Cho, M. H., San Jose Estepar, R., McDonald, M. L., Laird, N., Beaty, T. H., Washko, G., Crapo, J. D., Silverman, E. K. & Investigators, C. O. (2014). Genome-wide association identifies regulatory loci associated with distinct local histogram emphysema patterns. *Am J Respir Crit Care Med*, 190 (4): 399-409. doi: 10.1164/rccm.201403-0569OC.

Castranova, V., Huffman, L. J., Judy, D. J., Bylander, J. E., Lapp, L. N., Weber, S. L., Blackford, J. A. & Dey, R. D. (1998). Enhancement of nitric oxide production by pulmonary cells following silica exposure. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 5: 1165-9.

Cavarra, E., Bartalesi, B., Lucattelli, M., Fineschi, S., Lunghi, B., Gambelli, F., Ortiz, L. A., Martorana, P. A. & Lungarella, G. (2001). Effects of cigarette smoke in mice with different levels of alpha(1)-proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants. *Am J Respir Crit Care Med*, 164 (5): 886-90. doi: 10.1164/ajrccm.164.5.2010032.

Celli, B. R., Cote, C. G., Marin, J. M., Casanova, C., Montes de Oca, M., Mendez, R. A., Pinto Plata, V. & Cabral, H. J. (2004). The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 350 (10): 1005-12. doi: 10.1056/NEJMoa021322.

Cersini, A., Salvia, A. M. & Bernardini, M. L. (1998). Intracellular multiplication and virulence of *Shigella flexneri* auxotrophic mutants. *Infect Immun*, 66 (2): 549-57.

- Chappell, S. L., Daly, L., Lotya, J., Alsaegh, A., Guetta-Baranes, T., Roca, J., Rabinovich, R., Morgan, K., Millar, A. B., Donnelly, S. C., et al. (2011). The role of IREB2 and transforming growth factor beta-1 genetic variants in COPD: a replication case-control study. *BMC Med Genet*, 12: 24. doi: 10.1186/1471-2350-12-24.
- Charlson, E. S., Bittinger, K., Haas, A. R., Fitzgerald, A. S., Frank, I., Yadav, A., Bushman, F. D. & Collman, R. G. (2011). Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*, 184 (8): 957-63. doi: 10.1164/rccm.201104-0655OC.
- Chatterjee, I., Kriegeskorte, A., Fischer, A., Deiwick, S., Theimann, N., Proctor, R. A., Peters, G., Herrmann, M. & Kahl, B. C. (2008). *In vivo* mutations of thymidylate synthase (encoded by *thyA*) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 190 (3): 834-42. doi: 10.1128/jb.00912-07.
- Chaudhuri, N. & Sabroe, I. (2008). Basic science of the innate immune system and the lung. *Paediatr Respir Rev*, 9 (4): 236-42. doi: 10.1016/j.prrv.2008.03.002.
- Chauhan, S., Gupta, M. K., Goyal, A. & Dasgupta, D. J. (1990). Alterations in immunoglobulin and complement levels in chronic obstructive pulmonary-disease. *Indian Journal of Medical Research Section B-Biomedical Research Other Than Infectious Diseases*, 92: 241-245.
- Chilosi, M., Carloni, A., Rossi, A. & Poletti, V. (2013). Premature lung aging and cellular senescence in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and COPD/emphysema. *Transl Res*, 162 (3): 156-73. doi: 10.1016/j.trsl.2013.06.004.
- Chilvers, M. A. & O'Callaghan, C. (2000). Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev*, 1 (1): 27-34. doi: 10.1053/prrv.2000.0009.
- Cho, M. H., Boutaoui, N., Klanderman, B. J., Sylvia, J. S., Ziniti, J. P., Hersh, C. P., DeMeo, D. L., Hunninghake, G. M., Litonjua, A. A., Sparrow, D., et al. (2010). Variants in FAM13A are associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Genet*, 42 (3): 200-2. doi: 10.1038/ng.535.
- Cho, M. H., Castaldi, P. J., Wan, E. S., Siedlinski, M., Hersh, C. P., Demeo, D. L., Himes, B. E., Sylvia, J. S., Klanderman, B. J., Ziniti, J. P., et al. (2012). A genome-wide association study of COPD identifies a susceptibility locus on chromosome 19q13. *Hum Mol Genet*, 21 (4): 947-57. doi: 10.1093/hmg/ddr524.
- Cho, M. H., McDonald, M. L., Zhou, X., Mattheisen, M., Castaldi, P. J., Hersh, C. P., Demeo, D. L., Sylvia, J. S., Ziniti, J., Laird, N. M., et al. (2014). Risk loci for chronic obstructive pulmonary disease: a genome-wide association study and meta-analysis. *Lancet Respir Med*, 2 (3): 214-25. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70002-5.
- Choby, J. E. & Skaar, E. P. (2016). Heme synthesis and acquisition in bacterial pathogens. *J Mol Biol*, 428 (17): 3408-28. doi: 10.1016/j.jmb.2016.03.018.
- Cholon, D. M., Cutter, D., Richardson, S. K., Sethi, S., Murphy, T. F., Look, D. C. & St Geme, J. W., 3rd. (2008). Serial isolates of persistent *Haemophilus influenzae* in patients with chronic obstructive pulmonary disease express diminishing quantities of the HMW1 and HMW2 adhesins.

Infect Immun, 76 (10): 4463-8. doi: 10.1128/IAI.00499-08.

Churg, A., Tai, H., Coulthard, T., Wang, R. & Wright, J. L. (2006). Cigarette smoke drives small airway remodeling by induction of growth factors in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med*, 174 (12): 1327-34. doi: 10.1164/rccm.200605-585OC.

Churg, A., Cosio, M. & Wright, J. L. (2008). Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294 (4): L612-31. doi: 10.1152/ajplung.00390.2007.

Clark, H. W., Mackay, R. M., Deadman, M. E., Hood, D. W., Madsen, J., Moxon, E. R., Townsend, J. P., Reid, K. B. M., Ahmed, A., Shaw, A. J., et al. (2016). Crystal structure of a complex of surfactant protein D (SP-D) and *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide reveals shielding of core structures in SP-D-resistant strains. *Infect Immun*, 84 (5): 1585-1592. doi: 10.1128/IAI.01239-15.

Clark, S. E., Eichelberger, K. R. & Weiser, J. N. (2013). Evasion of killing by human antibody and complement through multiple variations in the surface oligosaccharide of *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol*, 88 (3): 603-18. doi: 10.1111/mmi.12214.

Clementi, C. F. & Murphy, T. F. (2011). Non-typeable *Haemophilus influenzae* invasion and persistence in the human respiratory tract. *Front Cell Infect Microbiol*, 1: 1. doi: 10.3389/fcimb.2011.00001.

Clementi, C. F., Hakansson, A. P. & Murphy, T. F. (2014). Internalization and trafficking of non-typeable *Haemophilus influenzae* in human respiratory epithelial cells and roles of IgA1 proteases for optimal invasion and persistence. *Infect Immun*, 82 (1): 433-44. doi: 10.1128/IAI.00864-13.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th Edition. CLSI M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. (2017).

Cloonan, S. M., Mumby, S., Adcock, I. M., Choi, A. M. K., Chung, K. F. & Quinlan, G. J. (2017). The “Iron”-y of iron overload and iron deficiency in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 196 (9): 1103-1112. doi: 10.1164/rccm.201702-0311PP.

Comeche Casanova, L., Echave-Sustaeta, J. M., Garcia Lujan, R., Albarran Lozano, I., Alonso Gonzalez, P. & Llorente Alonso, M. J. (2013). Prevalence of anaemia associated with chronic obstructive pulmonary disease. Study of associated variables. *Arch Bronconeumol*, 49 (9): 383-7. doi: 10.1016/j.arbres.2013.04.007.

Cope, L. D., Yogev, R., Muller-Eberhard, U. & Hansen, E. J. (1995). A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemoexin by *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol*, 177 (10): 2644-53.

Cope, L. D., Thomas, S. E., Hrkal, Z. & Hansen, E. J. (1998). Binding of heme-hemoexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 66 (9): 4511-6.

Cope, L. D., Love, R. P., Guinn, S. E., Gilep, A., Usanov, S., Estabrook, R. W., Hrkal, Z. & Han-

- sen, E. J. (2001). Involvement of HxuC outer membrane protein in utilization of hemoglobin by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 69 (4): 2353-63. doi: 10.1128/IAI.69.4.2353-2363.2001.
- Coppe, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A. & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 5: 99-118. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
- Corhay, J. L., Vincken, W., Schlessers, M., Bossuyt, P. & Imschoot, J. (2013). Chronic bronchitis in COPD patients is associated with increased risk of exacerbations: a cross-sectional multicentre study. *Int J Clin Pract*, 67 (12): 1294-301. doi: 10.1111/ijcp.12248.
- Corradi, M., Acampa, O., Goldoni, M., Andreoli, R., Milton, D., Sama, S. R., Rosiello, R., de Palma, G., Apostoli, P. & Mutti, A. (2009). Metallic elements in exhaled breath condensate and serum of patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Metallomics*, 1 (4): 339-45. doi: 10.1039/b907635b.
- Correa, R. G., Milutinovic, S. & Reed, J. C. (2012). Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Biosci Rep*, 32 (6): 597-608. doi: 10.1042/BSR20120055.
- Craig, J. E., Cliffe, A., Garnett, K. & High, N. J. (2001). Survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in macrophages. *FEMS Microbiol Lett*, 203 (1): 55-61.
- Cremona, T. P., Tschanz, S. A., von Garnier, C. & Benarafa, C. (2013). Serpin B1 deficiency is not associated with increased susceptibility to pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305 (12): L981-9. doi: 10.1152/ajplung.00181.2013.
- Dharwal, V. & Naura, A. S. (2018). PARP-1 inhibition ameliorates elastase induced lung inflammation and emphysema in mice. *Biochem Pharmacol*, 150: 24-34. doi: 10.1016/j.bcp.2018.01.027.
- Curstedt, T. & Johansson, J. (2010). Different effects of surfactant proteins B and C - implications for development of synthetic surfactants. *Neonatology*, 97 (4): 367-72. doi: 10.1159/000297767.
- Das, J., Mokrzan, E., Lakhani, V., Rosas, L., Jurcisek, J. A., Ray, W. C. & Bakaletz, L. O. (2017). Extracellular DNA and type IV pilus expression regulate the structure and kinetics of biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *MBio*, 8 (6). doi: 10.1128/mBio.01466-17.
- Dawid, S., Barenkamp, S. J. & St Geme, J. W., 3rd. (1999). Variation in expression of the *Haemophilus influenzae* HMW adhesins: a prokaryotic system reminiscent of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (3): 1077-82.
- de Astorza, B., Cortes, G., Crespi, C., Saus, C., Rojo, J. M. & Alberti, S. (2004). C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect Immun*, 72 (3): 1767-74.
- De Chiara, M., Hood, D., Muzzi, A., Pickard, D. J., Perkins, T., Pizza, M., Dougan, G., Rappuoli, R., Moxon, E. R., Soriani, M., et al. (2014). Genome sequencing of disease and carriage isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* identifies discrete population structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (14): 5439-44. doi: 10.1073/pnas.1403353111.

- de Groot, R., Campos, J., Moseley, S. L. & Smith, A. L. (1988). Molecular cloning and mechanism of trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 32 (4): 477-84.
- de Groot, R., Sluijter, M., de Bruyn, A., Campos, J., Goessens, W. H., Smith, A. L. & Hermans, P. W. (1996). Genetic characterization of trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 40 (9): 2131-6.
- Deadman, M. E., Lundstrom, S. L., Schweda, E. K., Moxon, E. R. & Hood, D. W. (2006). Specific amino acids of the glycosyltransferase LpsA direct the addition of glucose or galactose to the terminal inner core heptose of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide via alternative linkages. *J Biol Chem*, 281 (40): 29455-67. doi: 10.1074/jbc.M604908200.
- Deadman, M. E., Hermant, P., Engskog, M., Makepeace, K., Moxon, E. R., Schweda, E. K. & Hood, D. W. (2009). Lex2B, a phase-variable glycosyltransferase, adds either a glucose or a galactose to *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 77 (6): 2376-84. doi: 10.1128/IAI.01446-08.
- Degousee, N., Ghomashchi, F., Stefanski, E., Singer, A., Smart, B. P., Borregaard, N., Reithmeier, R., Lindsay, T. F., Lichtenberger, C., Reinisch, W., et al. (2002). Groups IV, V, and X phospholipases A2s in human neutrophils: role in eicosanoid production and gram-negative bacterial phospholipid hydrolysis. *J Biol Chem*, 277 (7): 5061-73. doi: 10.1074/jbc.M109083200.
- Deich, R. A. & Hoyer, L. C. (1982). Generation and release of DNA-binding vesicles by *Haemophilus influenzae* during induction and loss of competence. *J Bacteriol*, 152 (2): 855-64.
- DeMaria, T. F., Apicella, M. A., Nichols, W. A. & Leake, E. R. (1997). Evaluation of the virulence of nontypeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide *htrB* and *rfaD* mutants in the chinchilla model of otitis media. *Infect Immun*, 65 (11): 4431-5.
- DeMeo, D. L., Mariani, T., Bhattacharya, S., Srisuma, S., Lange, C., Litonjua, A., Bueno, R., Pillai, S. G., Lomas, D. A., Sparrow, D., et al. (2009). Integration of genomic and genetic approaches implicates IREB2 as a COPD susceptibility gene. *Am J Hum Genet*, 85 (4): 493-502. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.09.004.
- Desai, H., Eschberger, K., Wrona, C., Grove, L., Agrawal, A., Grant, B., Yin, J., Parameswaran, G. I., Murphy, T. & Sethi, S. (2014). Bacterial colonization increases daily symptoms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc*, 11 (3): 303-9. doi: 10.1513/AnnalsATS.201310-350OC.
- Deshmukh, H. S., Case, L. M., Wesselkamper, S. C., Borchers, M. T., Martin, L. D., Shertzer, H. G., Nadel, J. A. & Leikauf, G. D. (2005). Metalloproteinases mediate *mu*cin 5AC expression by epidermal growth factor receptor activation. *Am J Respir Crit Care Med*, 171 (4): 305-14. doi: 10.1164/rccm.200408-1003OC.
- Di Stefano, A., Caramori, G., Oates, T., Capelli, A., Lusuardi, M., Gnemmi, I., Ioli, F., Chung, K. F., Donner, C. F., Barnes, P. J., et al. (2002). Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*, 20 (3): 556-63.

- Di Stefano, A., Caramori, G., Gnemmi, I., Contoli, M., Vicari, C., Capelli, A., Magno, F., D'Anna, S. E., Zanini, A., Brun, P., et al. (2009). T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol*, 157 (2): 316-24. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03965.x.
- DiCamillo, S. J., Carreras, I., Panchenko, M. V., Stone, P. J., Nugent, M. A., Foster, J. A. & Panchenko, M. P. (2002). Elastase-released epidermal growth factor recruits epidermal growth factor receptor and extracellular signal-regulated kinases to down-regulate tropoelastin mRNA in lung fibroblasts. *J Biol Chem*, 277 (21): 18938-46. doi: 10.1074/jbc.M200243200.
- DiCamillo, S. J., Yang, S., Panchenko, M. V., Toselli, P. A., Naggar, E. F., Rich, C. B., Stone, P. J., Nugent, M. A. & Panchenko, M. P. (2006). Neutrophil elastase-initiated EGFR/MEK/ERK signaling counteracts stabilizing effect of autocrine TGF-beta on tropoelastin mRNA in lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291 (2): L232-43. doi: 10.1152/ajplung.00530.2005.
- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Freeman, C. M., McCloskey, L., Beck, J. M., Huffnagle, G. B. & Curtis, J. L. (2015). Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Ann Am Thorac Soc*, 12 (6): 821-30. doi: 10.1513/AnnalsATS.201501-029OC.
- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Freeman, C. M., McCloskey, L., Falkowski, N. R., Huffnagle, G. B. & Curtis, J. L. (2017). Bacterial topography of the healthy human lower respiratory tract. *Mbio*, 8 (1). doi: ARTN e02287-1610.1128/mBio.02287-16.
- Doe, C., Bafadhel, M., Siddiqui, S., Desai, D., Mistry, V., Rugman, P., McCormick, M., Woods, J., May, R., Sleeman, M. A., et al. (2010). Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest*, 138 (5): 1140-7. doi: 10.1378/chest.09-3058.
- Domenech, M., Pedrero-Vega, E., Prieto, A. & Garcia, E. (2016). Evidence of the presence of nucleic acids and beta-glucan in the matrix of non-typeable *Haemophilus influenzae in vitro* biofilms. *Sci Rep*, 6: 36424. doi: 10.1038/srep36424.
- Donaldson, G. C., Seemungal, T. A., Bhowmik, A. & Wedzicha, J. A. (2002). Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 57 (10): 847-52.
- Drannik, A. G., Pouladi, M. A., Robbins, C. S., Goncharova, S. I., Kianpour, S. & Stampfli, M. R. (2004). Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 170 (11): 1164-71. doi: 10.1164/rccm.200311-1521OC.
- Duan, M. C., Tang, H. J., Zhong, X. N. & Huang, Y. (2013). Persistence of Th17/Tc17 cell expression upon smoking cessation in mice with cigarette smoke-induced emphysema. *Clin Dev Immunol*, 2013: 350727. doi: 10.1155/2013/350727.
- Dunten, P. & Mowbray, S. L. (1995). Crystal structure of the dipeptide binding protein from *Escherichia coli* involved in active transport and chemotaxis. *Protein Sci*, 4 (11): 2327-34. doi: 10.1002/pro.5560041110.
- Duthie, G. G., Arthur, J. R. & James, W. P. (1991). Effects of smoking and vitamin E on blood

- antioxidant status. *Am J Clin Nutr*, 53 (4 Suppl): 1061S-1063S. doi: 10.1093/ajcn/53.4.1061S.
- Eagan, T. M., Damas, J. K., Ueland, T., Voll-Aanerud, M., Mollnes, T. E., Hardie, J. A., Bakke, P. S. & Aukrust, P. (2010). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a biomarker in COPD. *Chest*, 138 (4): 888-95. doi: 10.1378/chest.09-2718.
- Ebert, R. V. & Terracio, M. J. (1975). The bronchiolar epithelium in cigarette smokers. Observations with the scanning electron microscope. *Am Rev Respir Dis*, 111 (1): 4-11. doi: 10.1164/arrd.1975.111.1.4.
- Eltom, S., Stevenson, C. & Birrell, M. A. (2013). Cigarette smoke exposure as a model of inflammation associated with COPD. *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 5: Unit5 64. doi: 10.1002/0471141755.ph0564s60.
- Engskog, M. K., Yildirim, H. H., Li, J., Richards, J. C., Deadman, M., Hood, D. W. & Schweda, E. K. (2009). A dual role for the *lex2* locus: identification of galactosyltransferase activity in nontypeable *Haemophilus influenzae* strains 1124 and 2019. *Carbohydr Res*, 344 (5): 632-41. doi: 10.1016/j.carres.2009.01.005.
- Engstrom, G., Segelstorm, N., Ekberg-Aronsson, M., Nilsson, P. M., Lindgarde, F. & Lofdahl, C. G. (2009). Plasma markers of inflammation and incidence of hospitalisations for COPD: results from a population-based cohort study. *Thorax*, 64 (3): 211-5. doi: 10.1136/thx.2008.102079.
- Enne, V. I., King, A., Livermore, D. M. & Hall, L. M. (2002). Sulfonamide resistance in *Haemophilus influenzae* mediated by acquisition of *sul2* or a short insertion in chromosomal *folP*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46 (6): 1934-9.
- Ercoli, G., Tani, C., Pezzicoli, A., Vacca, I., Martinelli, M., Pecetta, S., Petracca, R., Rappuoli, R., Pizza, M., Norais, N., et al. (2015). LytM proteins play a crucial role in cell separation, outer membrane composition, and pathogenesis in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *MBio*, 6 (2): e02575. doi: 10.1128/mBio.02575-14.
- Ergan, B. & Ergun, R. (2016). Impact of anemia on short-term survival in severe COPD exacerbations: a cohort study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 11: 1775-83. doi: 10.2147/COPD.S111758.
- Erwin, A. L., Allen, S., Ho, D. K., Bonthuis, P. J., Jarisch, J., Nelson, K. L., Tsao, D. L., Unrath, W. C., Watson, M. E., Jr., Gibson, B. W., et al. (2006). Role of *lgtC* in resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain R2866 to human serum. *Infect Immun*, 74 (11): 6226-35. doi: 10.1128/IAI.00722-06.
- Euba, B., Moleres, J., Segura, V., Viadas, C., Morey, P., Moranta, D., Leiva, J., de-Torres, J. P., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. (2015a). Genome expression profiling-based identification and administration efficacy of host-directed antimicrobial drugs against respiratory infection by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 59 (12): 7581-92. doi: 10.1128/AAC.01278-15.
- Euba, B., Moleres, J., Viadas, C., Barberan, M., Caballero, L., Grillo, M. J., Bengoechea, J. A., de-Torres, J. P., Linares, J., Leiva, J., et al. (2015b). Relationship between azithromycin suscepti-

- bility and administration efficacy for nontypeable *Haemophilus influenzae* respiratory infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 59 (5): 2700-12. doi: 10.1128/AAC.04447-14.
- Euba, B., Moleres, J., Viadas, C., Ruiz de los Mozos, I., Valle, J., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. (2015c). Relative contribution of P5 and Hap surface proteins to nontypable *Haemophilus influenzae* interplay with the host upper and lower airways. *PLoS One*, 10 (4): e0123154. doi: 10.1371/journal.pone.0123154.
- Euba, B., Lopez-Lopez, N., Rodriguez-Arce, I., Fernandez-Calvet, A., Barberan, M., Caturla, N., Marti, S., Diez-Martinez, R. & Garmendia, J. (2017). Resveratrol therapeutics combines both antimicrobial and immunomodulatory properties against respiratory infection by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Sci Rep*, 7 (1): 12860. doi: 10.1038/s41598-017-13034-7.
- Eurlings, I. M., Dentener, M. A., Mercken, E. M., de Cabo, R., Bracke, K. R., Vernooij, J. H., Wouters, E. F. & Reynaert, N. L. (2014). A comparative study of matrix remodeling in chronic models for COPD; mechanistic insights into the role of TNF-alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307 (7): L557-65. doi:10.1152/ajplung.00116.2014.
- Fahy, J. V. & Dickey, B. F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med*, 363 (23): 2233-47. doi: 10.1056/NEJMra0910061.
- Fereol, S., Fodil, R., Pelle, G., Louis, B. & Isabey, D. (2008). Cell mechanics of alveolar epithelial cells (AECs) and macrophages (AMs). *Respir Physiol Neurobiol*, 163 (1-3): 3-16. doi: 10.1016/j.resp.2008.04.018.
- Fernandez-Calvet, A., Rodriguez-Arce, I., Almagro, G., Moleres, J., Euba, B., Caballero, L., Marti, S., Ramos-Vivas, J., Bartholomew, T. L., Morales, X., et al. (2018). Modulation of *Haemophilus influenzae* interaction with hydrophobic molecules by the VacJ/MlaA lipoprotein impacts strongly on its interplay with the airways. *Sci Rep*, 8 (1): 6872. doi: 10.1038/s41598-018-25232-y.
- Findlay, W. A. & Redfield, R. J. (2009). Coevolution of DNA uptake sequences and bacterial proteomes. *Genome Biol Evol*, 1: 45-55. doi: 10.1093/gbe/evp005.
- Fink, D. L., Green, B. A. & St Geme, J. W., 3rd. (2002). The *Haemophilus influenzae* Hap auto-transporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. *Infect Immun*, 70 (9): 4902-7.
- Finney, L. J., Ritchie, A., Pollard, E., Johnston, S. L. & Mallia, P. (2014). Lower airway colonization and inflammatory response in COPD: a focus on *Haemophilus influenzae*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 9: 1119-32. doi: 10.2147/COPD.S54477.
- Fischer, B. M., Domowicz, D. A., Zheng, S., Carter, J. L., McElvaney, N. G., Taggart, C., Lehmann, J. R., Voynow, J. A. & Ghio, A. J. (2009). Neutrophil elastase increases airway epithelial nonheme iron levels. *Clin Transl Sci*, 2 (5): 333-9. doi: 10.1111/j.1752-8062.2009.00151.x.
- Fischer, B. M., Voynow, J. A. & Ghio, A. J. (2015). COPD: balancing oxidants and antioxidants. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 10: 261-76. doi: 10.2147/COPD.S42414.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., et al. (1995). Whole-genome random

- sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269 (5223): 496-512.
- Floreani, A. A., Wyatt, T. A., Stoner, J., Sanderson, S. D., Thompson, E. G., Allen-Gipson, D. & Heires, A. J. (2003). Smoke and C5a induce airway epithelial intercellular adhesion molecule-1 and cell adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29 (4): 472-82. doi: 10.1165/rcmb.2002-0143OC.
- Fournier, C., Smith, A. & Delepelaire, P. (2011). Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity. *Mol Microbiol*, 80 (1): 133-48. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07562.x.
- Foxwell, A. R., Kyd, J. M. & Cripps, A. W. (1998). Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62 (2): 294-308.
- Gaggar, A., Jackson, P. L., Noerager, B. D., O'Reilly, P. J., McQuaid, D. B., Rowe, S. M., Clancy, J. P. & Blalock, J. E. (2008). A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J Immunol*, 180 (8): 5662-9.
- Gammella, E., Buratti, P., Cairo, G. & Recalcati, S. (2014). Macrophages: central regulators of iron balance. *Metallomics*, 6 (8): 1336-45. doi: 10.1039/c4mt00104d.
- Ganesan, R., Hos, N. J., Gutierrez, S., Fischer, J., Stepek, J. M., Daglidu, E., Kronke, M. & Robinson, N. (2017). *Salmonella typhimurium* disrupts Sirt1/AMPK checkpoint control of mTOR to impair autophagy. *PLoS Pathog*, 13 (2): e1006227. doi: 10.1371/journal.ppat.1006227.
- Ganesan, S., Comstock, A. T., Kinker, B., Mancuso, P., Beck, J. M. & Sajjan, U. S. (2014). Combined exposure to cigarette smoke and nontypeable *Haemophilus influenzae* drives development of a COPD phenotype in mice. *Respir Res*, 15: 11. doi: 10.1186/1465-9921-15-11.
- Ganz, T. (2012). Macrophages and systemic iron homeostasis. *J Innate Immun*, 4 (5-6): 446-53. doi: 10.1159/000336423.
- Gao, R., Ma, Z., Hu, Y., Chen, J., Shetty, S. & Fu, J. (2015). Sirt1 restrains lung inflammasome activation in a murine model of sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308 (8): L847-53. doi: 10.1152/ajplung.00274.2014.
- Gao, W., Li, L., Wang, Y., Zhang, S., Adcock, I. M., Barnes, P. J., Huang, M. & Yao, X. (2015). Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology*, 20 (5): 722-9. doi: 10.1111/resp.12542.
- Garmendia, J., Viadas, C., Calatayud, L., Mell, J. C., Marti-Llitas, P., Euba, B., Llobet, E., Gil, C., Bengoechea, J. A., Redfield, R. J., et al. (2014). Characterization of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates recovered from adult patients with underlying chronic lung disease reveals genotypic and phenotypic traits associated with persistent infection. *PLoS One*, 9 (5): e97020. doi: 10.1371/journal.pone.0097020.
- Gaschler, G. J., Skrtic, M., Zavitz, C. C., Lindahl, M., Onnervik, P. O., Murphy, T. F., Sethi, S. & Stampfli, M. R. (2009). Bacteria challenge in smoke-exposed mice exacerbates inflammation and skews the inflammatory profile. *Am J Respir Crit Care Med*, 179 (8): 666-75. doi: 10.1164/rccm.200808-1306OC.

- Gaschler, G. J., Zavitz, C. C., Bauer, C. M. & Stampfli, M. R. (2010). Mechanisms of clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* from cigarette smoke-exposed mouse lungs. *Eur Respir J*, 36 (5): 1131-42. doi: 10.1183/09031936.00113909.
- Gawronski, J. D., Wong, S. M., Giannoukos, G., Ward, D. V. & Akerley, B. J. (2009). Tracking insertion mutants within libraries by deep sequencing and a genome-wide screen for *Haemophilus* genes required in the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (38): 16422-7. doi: 10.1073/pnas.0906627106.
- Geraghty, P., Hardigan, A. & Foronjy, R. F. (2014). Cigarette smoke activates the proto-oncogene *c-src* to promote airway inflammation and lung tissue destruction. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 50 (3): 559-70. doi: 10.1165/rcmb.2013-0258OC.
- Ghio, A. J., Turi, J. L., Yang, F., Garrick, L. M. & Garrick, M. D. (2006). Iron homeostasis in the lung. *Biol Res*, 39 (1): 67-77.
- Ghio, A. J., Hilborn, E. D., Stonehuerner, J. G., Dailey, L. A., Carter, J. D., Richards, J. H., Crissman, K. M., Foronjy, R. F., Uyeminami, D. L. & Pinkerton, K. E. (2008a). Particulate matter in cigarette smoke alters iron homeostasis to produce a biological effect. *Am J Respir Crit Care Med*, 178 (11): 1130-8. doi: 10.1164/rccm.200802-334OC.
- Ghio, A. J., Stonehuerner, J. G., Richards, J. H., Crissman, K. M., Roggli, V. L., Piantadosi, C. A. & Carraway, M. S. (2008b). Iron homeostasis and oxidative stress in idiopathic pulmonary alveolar proteinosis: a case-control study. *Respir Res*, 9: 10. doi: 10.1186/1465-9921-9-10.
- Ghio, A. J. (2009). Disruption of iron homeostasis and lung disease. *Biochim Biophys Acta*, 1790 (7): 731-9. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.11.004.
- Ghorani, V., Boskabady, M. H., Khazdair, M. R. & Kianmeher, M. (2017). Experimental animal models for COPD: a methodological review. *Tob Induc Dis*, 15: 25. doi: 10.1186/s12971-017-0130-2.
- Gilsdorf, J. R., Marrs, C. F. & Foxman, B. (2004). *Haemophilus influenzae*: genetic variability and natural selection to identify virulence factors. *Infect Immun*, 72 (5): 2457-61.
- Glasser, J. R. & Mallampalli, R. K. (2012). Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes Infect*, 14 (1): 17-25. doi: 10.1016/j.micinf.2011.08.019.
- Gollwitzer, E. S., Saglani, S., Trompette, A., Yadava, K., Sherburn, R., McCoy, K. D., Nicod, L. P., Lloyd, C. M. & Marsland, B. J. (2014). Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med*, 20 (6): 642-7. doi: 10.1038/nm.3568.
- Gomez-Gil, L., Schurch, D., Goormaghtigh, E. & Perez-Gil, J. (2009). Pulmonary surfactant protein SP-C counteracts the deleterious effects of cholesterol on the activity of surfactant films under physiologically relevant compression-expansion dynamics. *Biophys J*, 97 (10): 2736-45. doi: 10.1016/j.bpj.2009.08.045.
- Goodman, S. D., Oberfell, K. P., Jurcisek, J. A., Novotny, L. A., Downey, J. S., Ayala, E. A., Tjokro, N., Li, B., Justice, S. S. & Bakaletz, L. O. (2011). Biofilms can be dispersed by focusing

- the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol*, 4 (6): 625-37. doi: 10.1038/mi.2011.27.
- Gosker, H. R., Schrauwen, P., Hesselink, M. K., Schaart, G., van der Vusse, G. J., Wouters, E. F. & Schols, A. M. (2003). Uncoupling protein-3 content is decreased in peripheral skeletal muscle of patients with COPD. *Eur Respir J*, 22 (1): 88-93.
- Gosker, H. R., Schrauwen, P., Broekhuizen, R., Hesselink, M. K., Moonen-Kornips, E., Ward, K. A., Franssen, F. M., Wouters, E. F. & Schols, A. M. (2006). Exercise training restores uncoupling protein-3 content in limb muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290 (5): E976-81. doi: 10.1152/ajpendo.00336.2005.
- Gould, J. M. & Weiser, J. N. (2002). The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *J Infect Dis*, 186 (3): 361-71. doi: 10.1086/341658.
- Gozzelino, R. & Arosio, P. (2016). Iron homeostasis in health and disease. *Int J Mol Sci*, 17 (1). doi: 10.3390/ijms17010130.
- Granata, F., Nardicchi, V., Loffredo, S., Frattini, A., Ilaria Staiano, R., Agostini, C. & Trigiani, M. (2009). Secreted phospholipases A(2): A proinflammatory connection between macrophages and mast cells in the human lung. *Immunobiology*, 214 (9-10): 811-21. doi: 10.1016/j.imbio.2009.06.006.
- Grant, G. B., Campbell, H., Dowell, S. F., Graham, S. M., Klugman, K. P., Mulholland, E. K., Steinhoff, M., Weber, M. W., Qazi, S., World Health Organization Department of, C., et al. (2009). Recommendations for treatment of childhood non-severe pneumonia. *Lancet Infect Dis*, 9 (3): 185-96. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70044-1.
- Gray-Owen, S. D., Loosmore, S. & Schryvers, A. B. (1995). Identification and characterization of genes encoding the human transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 63 (4): 1201-10.
- Gray-Owen, S. D. & Schryvers, A. B. (1995). Characterization of transferrin binding proteins 1 and 2 in invasive type b and nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 63 (10): 3809-15.
- Greenberg, S. B., Allen, M., Wilson, J. & Atmar, R. L. (2000). Respiratory viral infections in adults with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 162 (1): 167-73. doi: 10.1164/ajrcm.162.1.9911019.
- Greenhill, A. R., Phuanukoonnon, S., Michael, A., Yoannes, M., Orami, T., Smith, H., Murphy, D., Blyth, C., Reeder, J., Siba, P., Pomat, W. & Lehmann, D. (2015). *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in paediatric meningitis patients at Goroka General Hospital, Papua New Guinea: serotype distribution and antimicrobial susceptibility in the pre-vaccine era. *BMC Infect Dis*, 15: 485. doi: 10.1186/s12879-015-1197-0.
- Grillo, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyon, I. & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet Res*, 43: 29. doi: 10.1186/1297-9716-43-29.

- Groneberg, D. A. & Chung, K. F. (2004). Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 5: 18. doi: 10.1186/1465-9921-5-18.
- Gronow, S., Brabetz, W., Lindner, B. & Brade, H. (2005). OpsX from *Haemophilus influenzae* represents a novel type of heptosyltransferase I in lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol*, 187 (17): 6242-7. doi: 10.1128/JB.187.17.6242-6247.2005.
- Gu, B. H., Madison, M. C., Corry, D. & Kheradmand, F. (2018). Matrix remodeling in chronic lung diseases. *Matrix Biol*. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.012.
- Guo, Y., Guo, G., Mao, X., Zhang, W., Xiao, J., Tong, W., Liu, T., Xiao, B., Liu, X., Feng, Y., et al. (2008). Functional identification of HugZ, a heme oxygenase from *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol*, 8: 226. doi: 10.1186/1471-2180-8-226.
- Hallstrom, T., Trajkovska, E., Forsgren, A. & Riesbeck, K. (2006). *Haemophilus influenzae* surface fibrils contribute to serum resistance by interacting with vitronectin. *J Immunol*, 177 (1): 430-6.
- Hallstrom, T., Jarva, H., Riesbeck, K. & Blom, A. M. (2007). Interaction with C4b-binding protein contributes to nontypeable *Haemophilus influenzae* serum resistance. *J Immunol*, 178 (10): 6359-66.
- Hallstrom, T., Zipfel, P. F., Blom, A. M., Lauer, N., Forsgren, A. & Riesbeck, K. (2008). *Haemophilus influenzae* interacts with the human complement inhibitor factor H. *J Immunol*, 181 (1): 537-45.
- Hallstrom, T. & Riesbeck, K. (2010). *Haemophilus influenzae* and the complement system. *Trends Microbiol*, 18 (6): 258-65. doi: 10.1016/j.tim.2010.03.007.
- Hallstrom, T., Singh, B., Resman, F., Blom, A. M., Morgelin, M. & Riesbeck, K. (2011). *Haemophilus influenzae* protein E binds to the extracellular matrix by concurrently interacting with laminin and vitronectin. *J Infect Dis*, 204 (7): 1065-74. doi: 10.1093/infdis/jir459.
- Han, M. K., Postma, D., Mannino, D. M., Giardino, N. D., Buist, S., Curtis, J. L. & Martinez, F. J. (2007). Gender and chronic obstructive pulmonary disease: why it matters. *Am J Respir Crit Care Med*, 176 (12): 1179-84. doi: 10.1164/rccm.200704-553CC.
- Hancock, D. B., Eijgelsheim, M., Wilk, J. B., Gharib, S. A., Loehr, L. R., Marcicante, K. D., Franceschini, N., van Durme, Y. M., Chen, T. H., Barr, R. G., et al. (2010). Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple *loci* associated with pulmonary function. *Nat Genet*, 42 (1): 45-52. doi: 10.1038/ng.500.
- Hanson, M. S., Pelzel, S. E., Latimer, J., Muller-Eberhard, U. & Hansen, E. J. (1992a). Identification of a genetic *locus* of *Haemophilus influenzae* type b necessary for the binding and utilization of heme bound to human hemopexin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (5): 1973-7.
- Hanson, M. S., Slaughter, C. & Hansen, E. J. (1992b). The hbpA gene of *Haemophilus influenzae* type b encodes a heme-binding lipoprotein conserved among heme-dependent *Haemophilus* species. *Infect Immun*, 60 (6): 2257-66.

- Hardaker, E. L., Freeman, M. S., Dale, N., Bahra, P., Raza, F., Banner, K. H. & Poll, C. (2010). Exposing rodents to a combination of tobacco smoke and lipopolysaccharide results in an exaggerated inflammatory response in the lung. *Br J Pharmacol*, 160 (8): 1985-96. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00857.x.
- Hardaker, L., Bahra, P., de Billy, B. C., Freeman, M., Kupfer, N., Wyss, D. & Trifilieff, A. (2012). The ion channel transient receptor potential melastatin-2 does not play a role in inflammatory mouse models of chronic obstructive pulmonary diseases. *Respir Res*, 13: 30. doi: 10.1186/1465-9921-13-30.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J. M. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 276 (8): 5707-13. doi: 10.1074/jbc.M008557200.
- Harder, J. & Schroder, J. M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem*, 277 (48): 46779-84. doi: 10.1074/jbc.M207587200.
- Hare, K. M., Singleton, R. J., Grimwood, K., Valery, P. C., Cheng, A. C., Morris, P. S., Leach, A. J., Smith-Vaughan, H. C., Chatfield, M., Redding, G., et al. (2013). Longitudinal nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of respiratory bacteria in indigenous Australian and Alaska native children with bronchiectasis. *PLoS One*, 8 (8): e70478. doi: 10.1371/journal.pone.0070478.
- Hariadi, N. I., Zhang, L., Patel, M., Sandstedt, S. A., Davis, G. S., Marrs, C. F. & Gilsdorf, J. R. (2015). Comparative profile of heme acquisition genes in disease-causing and colonizing Nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. *J Clin Microbiol*, 53 (7): 2132-7. doi: 10.1128/JCM.00345-15.
- Harrison, A., Dyer, D. W., Gillaspay, A., Ray, W. C., Mungur, R., Carson, M. B., Zhong, H., Gipson, J., Gipson, M., Johnson, L. S., et al. (2005). Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable *Haemophilus influenzae*: comparative study with *H. influenzae* serotype d, strain KW20. *J Bacteriol*, 187 (13): 4627-36. doi: 10.1128/JB.187.13.4627-4636.2005.
- Harrison, A., Ray, W. C., Baker, B. D., Armbruster, D. W., Bakaletz, L. O. & Munson, R. S., Jr. (2007). The OxyR regulon in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 189 (3): 1004-12. doi: 10.1128/JB.01040-06.
- Harrison, A., Santana, E. A., Szelestey, B. R., Newsom, D. E., White, P. & Mason, K. M. (2013). Ferric uptake regulator and its role in the pathogenesis of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 81 (4): 1221-33. doi: 10.1128/IAI.01227-12.
- Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K., Senior, R. M. & Shapiro, S. D. (1997). Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*, 277 (5334): 2002-4.
- Henderson, W. R., Jr., Astley, S. J., McCready, M. M., Kushmerick, P., Casey, S., Becker, J. W. & Ramsey, B. W. (1994). Oral absorption of omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis who have pancreatic insufficiency and in healthy control subjects. *J Pediatr*, 124 (3): 400-8.
- Hendrix, A. Y. & Kheradmand, F. (2017). The role of matrix metalloproteinases in development, repair, and destruction of the lungs. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 148: 1-29. doi: 10.1016/

bs.pmbts.2017.04.004.

Herath, S. C. & Poole, P. (2013). Prophylactic antibiotic therapy for chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cochrane Database Syst Rev* (11): CD009764. doi: 10.1002/14651858.CD009764.pub2.

Herbert, M. A., Hayes, S., Deadman, M. E., Tang, C. M., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (2002). Signature Tagged Mutagenesis of *Haemophilus influenzae* identifies genes required for *in vivo* survival. *Microb Pathog*, 33 (5): 211-23.

Herrington, D. A. & Sparling, P. F. (1985). *Haemophilus influenzae* can use human transferrin as a sole source for required iron. *Infect Immun*, 48 (1): 248-51.

Herriott, R. M., Meyer, E. Y., Vogt, M. & Modan, M. (1970). Defined medium for growth of *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 101 (2): 513-6.

Hiemstra, P. S., McCray, P. B., Jr. & Bals, R. (2015). The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J*, 45 (4): 1150-62. doi: 10.1183/09031936.00141514.

Hirota, J. A., Hirota, S. A., Warner, S. M., Stefanowicz, D., Shaheen, F., Beck, P. L., Macdonald, J. A., Hackett, T. L., Sin, D. D., Van Eeden, S., et al. (2012). The airway epithelium nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein 3 inflammasome is activated by urban particulate matter. *J Allergy Clin Immunol*, 129 (4): 1116-25 e6. doi: 10.1016/j.jaci.2011.11.033.

Ho, D. K., Ram, S., Nelson, K. L., Bonthuis, P. J. & Smith, A. L. (2007). IgtC expression modulates resistance to C4b deposition on an invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Immunol*, 178 (2): 1002-12.

Hodge, S., Hodge, G., Scicchitano, R., Reynolds, P. N. & Holmes, M. (2003). Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol*, 81 (4): 289-96. doi: 10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01170.x.

Hogasen, K., Mollnes, T. E., Harboe, M., Gotze, O., Hammer, H. B. & Oppermann, M. (1995). Terminal complement pathway activation and low lysis inhibitors in rheumatoid arthritis synovial fluid. *J Rheumatol*, 22 (1): 24-8.

Hogg, J. C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W. M., Buzatu, L., Cherniack, R. M., Rogers, R. M., Sciurba, F. C., Coxson, H. O., et al. (2004). The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 350 (26): 2645-53. doi: 10.1056/NEJMoa032158.

Hogg, J. C., McDonough, J. E., Gosselink, J. V. & Hayashi, S. (2009). What drives the peripheral lung-remodeling process in chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc*, 6 (8): 668-72. doi: 10.1513/pats.200907-079DP.

Holland, J., Langford, P. R., Towner, K. J. & Williams, P. (1992). Evidence for *in vivo* expression of transferrin-binding proteins in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun*, 60 (7): 2986-91.

- Holtzman, M. J., Tyner, J. W., Kim, E. Y., Lo, M. S., Patel, A. C., Shornick, L. P., Agapov, E. & Zhang, Y. (2005). Acute and chronic airway responses to viral infection: implications for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2 (2): 132-40. doi: 10.1513/pats.200502-015AW.
- Hong, W., Mason, K., Jursisek, J., Novotny, L., Bakaletz, L. O. & Swords, W. E. (2007). Phosphorylcholine decreases early inflammation and promotes the establishment of stable biofilm communities of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP in a chinchilla model of otitis media. *Infect Immun*, 75 (2): 958-65. doi: 10.1128/IAI.01691-06.
- Hong, W., Juneau, R. A., Pang, B. & Swords, W. E. (2009). Survival of bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes nontypeable *Haemophilus influenzae* persistence in the chinchilla model for otitis media. *J Innate Immun*, 1 (3): 215-24. doi: 10.1159/000205937.
- Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martin, A., Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C. & Moxon, E. R. (1996). Use of the complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol*, 22 (5): 951-65.
- Hood, D. W., Makepeace, K., Deadman, M. E., Rest, R. F., Thibault, P., Martin, A., Richards, J. C. & Moxon, E. R. (1999a). Sialic acid in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: strain distribution, influence on serum resistance and structural characterization. *Mol Microbiol*, 33 (4): 679-92.
- Hood, D. W., Richards, J. C. & Moxon, E. R. (1999b). *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. *Biochem Soc Trans*, 27 (4): 493-8.
- Hood, D. W., Cox, A. D., Wakarchuk, W. W., Schur, M., Schweda, E. K., Walsh, S. L., Deadman, M. E., Martin, A., Moxon, E. R. & Richards, J. C. (2001). Genetic basis for expression of the major globotetraose-containing lipopolysaccharide from *H. influenzae* strain Rd (RM118). *Glycobiology*, 11 (11): 957-67.
- Hood, D. W., Deadman, M. E., Cox, A. D., Makepeace, K., Martin, A., Richards, J. C. & Moxon, E. R. (2004). Three genes, *lgtF*, *lic2C* and *lpsA*, have a primary role in determining the pattern of oligosaccharide extension from the inner core of *Haemophilus influenzae* LPS. *Microbiology*, 150 (Pt 7): 2089-97. doi: 10.1099/mic.0.26912-0.
- Hood, M. I. & Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol*, 10 (8): 525-37. doi: 10.1038/nrmicro2836.
- Hooda, J., Cadinu, D., Alam, M. M., Shah, A., Cao, T. M., Sullivan, L. A., Brekken, R. & Zhang, L. (2013). Enhanced heme function and mitochondrial respiration promote the progression of lung cancer cells. *PLoS One*, 8 (5): e63402. doi: 10.1371/journal.pone.0063402.
- Horio, Y., Ichiyasu, H., Kojima, K., Saita, N., Migiyama, Y., Iriki, T., Fujii, K., Niki, T., Hirashima, M. & Kohrogi, H. (2017). Protective effect of Galectin-9 in murine model of lung emphysema: Involvement of neutrophil migration and MMP-9 production. *PLoS One*, 12 (7): e0180742. doi: 10.1371/journal.pone.0180742.

- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D. R., Latz, E. & Fitzgerald, K. A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, 458 (7237): 514-8. doi: 10.1038/nature07725.
- Houghton, A. M. (2012). Endogenous modifiers of cigarette smoke exposure within the lung. *Proc Am Thorac Soc*, 9 (2): 66-8. doi: 10.1513/pats.201108-046MS.
- Hu, Y., Jiang, F., Guo, Y., Shen, X., Zhang, Y., Zhang, R., Guo, G., Mao, X., Zou, Q. & Wang, D. C. (2011). Crystal structure of HugZ, a novel heme oxygenase from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 286 (2): 1537-44. doi: 10.1074/jbc.M110.172007.
- Huang, W. & Wilks, A. (2017). Extracellular heme uptake and the challenge of bacterial cell membranes. *Annu Rev Biochem*, 86: 799-823. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014214.
- Humphries, H. E. & High, N. J. (2002). The role of licA phase variation in the pathogenesis of invasive disease by *Haemophilus influenzae* type b. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 34 (3): 221-30.
- Hurst, J. R., Vestbo, J., Anzueto, A., Locantore, N., Mullerova, H., Tal-Singer, R., Miller, B., Lomas, D. A., Agustí, A., Macnee, W., et al. (2010). Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 363 (12): 1128-38. doi: 10.1056/NEJMoa0909883.
- Huvenne, W., Lanckacker, E. A., Krysko, O., Bracke, K. R., Demoor, T., Hellings, P. W., Brusselle, G. G., Joos, G. F., Bachert, C. & Maes, T. (2011). Exacerbation of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation by *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in mice. *Respir Res*, 12: 69. doi: 10.1186/1465-9921-12-69.
- Idicula, W. K., Jurcisek, J. A., Cass, N. D., Ali, S., Goodman, S. D., Elmaraghy, C. A., Jatana, K. R. & Bakaletz, L. O. (2016). Identification of biofilms in post-tympanostomy tube otorrhea. *Laryngoscope*, 126 (8): 1946-51. doi: 10.1002/lary.25826.
- Ikeda, M., Enomoto, N., Hashimoto, D., Fujisawa, T., Inui, N., Nakamura, Y., Suda, T. & Nagata, T. (2015). Nontypeable *Haemophilus influenzae* exploits the interaction between protein-E and vitronectin for the adherence and invasion to bronchial epithelial cells. *BMC Microbiol*, 15: 263. doi: 10.1186/s12866-015-0600-8.
- Ito, K. & Barnes, P. J. (2009). COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest*, 135 (1): 173-180. doi: 10.1378/chest.08-1419.
- Ito, S., Araya, J., Kurita, Y., Kobayashi, K., Takasaka, N., Yoshida, M., Hara, H., Minagawa, S., Wakui, H., Fujii, S., et al. (2015). PARK2-mediated mitophagy is involved in regulation of HBEC senescence in COPD pathogenesis. *Autophagy*, 11 (3): 547-59. doi: 10.1080/15548627.2015.1017190.
- Jarosik, G. P. & Hansen, E. J. (1995). Cloning and sequencing of the *Haemophilus influenzae* *exbB* and *exbD* genes. *Gene*, 152 (1): 89-92.
- Jarosik, G. P., Maciver, I. & Hansen, E. J. (1995). Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus influenzae* requires an intact *tonB* gene. *Infect Immun*, 63 (2): 710-3.

- Jin, F. Y., Nathan, C., Radzioch, D. & Ding, A. (1997). Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell*, 88 (3): 417-26.
- Jin, H., Ren, Z., Pozsgay, J. M., Elkins, C., Whitby, P. W., Morton, D. J. & Stull, T. L. (1996). Cloning of a DNA fragment encoding a heme-repressible hemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 64 (8): 3134-41.
- Jin, H., Ren, Z., Whitby, P. W., Morton, D. J. & Stull, T. L. (1999). Characterization of *hgpA*, a gene encoding a haemoglobin/haemoglobin-haptoglobin-binding protein of *Haemophilus influenzae*. *Microbiology*, 145 (Pt 4): 905-14. doi: 10.1099/13500872-145-4-905.
- Jobse, B. N., Rhem, R. G., Wang, I. Q., Counter, W. B., Stampfli, M. R. & Labiris, N. R. (2013). Detection of lung dysfunction using ventilation and perfusion SPECT in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *J Nucl Med*, 54 (4): 616-23. doi: 10.2967/jnumed.112.111419.
- John, G., Kohse, K., Orasche, J., Reda, A., Schnelle-Kreis, J., Zimmermann, R., Schmid, O., Eickelberg, O. & Yildirim, A. O. (2014). The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models. *Clin Sci (Lond)*, 126 (3): 207-21. doi: 10.1042/CS20130117.
- Johnson, R. W., McGillivray, G., Denoel, P., Poolman, J. & Bakaletz, L. O. (2011). Abrogation of nontypeable *Haemophilus influenzae* protein D function reduces phosphorylcholine decoration, adherence to airway epithelial cells, and fitness in a chinchilla model of otitis media. *Vaccine*, 29 (6): 1211-21. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.003.
- Jolivet-Gougeon, A., Kovacs, B., Le Gall-David, S., Le Bars, H., Bousarghin, L., Bonneure-Mallet, M., Lobel, B., Guille, F., Soussy, C. J. & Tenke, P. (2011). Bacterial hypermutation: clinical implications. *J Med Microbiol*, 60 (Pt 5): 563-73. doi: 10.1099/jmm.0.024083-0.
- Jones, B., Donovan, C., Liu, G., Gomez, H. M., Chimankar, V., Harrison, C. L., Wiegman, C. H., Adcock, I. M., Knight, D. A., Hirota, J. A., et al. (2017). Animal models of COPD: What do they tell us? *Respirology*, 22 (1): 21-32. doi: 10.1111/resp.12908.
- Joo, H. S., Fu, C. I. & Otto, M. (2016). Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 371 (1695). doi: 10.1098/rstb.2015.0292.
- Juliao, P. C., Marrs, C. F., Xie, J. & Gilsdorf, J. R. (2007). Histidine auxotrophy in commensal and disease-causing nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 189 (14): 4994-5001. doi: 10.1128/JB.00146-07.
- Juneau, R. A., Pang, B., Weimer, K. E., Armbruster, C. E. & Swords, W. E. (2011). Nontypeable *Haemophilus influenzae* initiates formation of neutrophil extracellular traps. *Infect Immun*, 79 (1): 431-8. doi: 10.1128/IAI.00660-10.
- Juneau, R. A., Pang, B., Armbruster, C. E., Murrain, K. A., Perez, A. C. & Swords, W. E. (2015). Peroxiredoxin-glutaredoxin and catalase promote resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* 86-028NP to oxidants and survival within neutrophil extracellular traps. *Infect Immun*, 83 (1): 239-46. doi: 10.1128/IAI.02390-14.

- Jurcisek, J. A. & Bakaletz, L. O. (2007). Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* *in vivo* contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *J Bacteriol*, 189 (10): 3868-75. doi: 10.1128/JB.01935-06.
- Jurcisek, J. A., Bookwalter, J. E., Baker, B. D., Fernandez, S., Novotny, L. A., Munson, R. S., Jr. & Bakaletz, L. O. (2007). The PilA protein of non-typeable *Haemophilus influenzae* plays a role in biofilm formation, adherence to epithelial cells and colonization of the mammalian upper respiratory tract. *Mol Microbiol*, 65 (5): 1288-99. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05864.x.
- Kaczmarek, F. S., Gootz, T. D., Dib-Hajj, F., Shang, W., Hallowell, S. & Cronan, M. (2004). Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (5): 1630-9.
- Kahl, B. C., Belling, G., Reichelt, R., Herrmann, M., Proctor, R. A. & Peters, G. (2003). Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol*, 41 (1): 410-3.
- Kahl, B. C., Belling, G., Becker, P., Chatterjee, I., Wardecki, K., Hilgert, K., Cheung, A. L., Peters, G. & Herrmann, M. (2005). Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect Immun*, 73 (7): 4119-26. doi: 10.1128/IAI.73.7.4119-4126.2005.
- Kahl, B. C. (2014). Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*-a bacterial survival strategy. *Infect Genet Evol*, 21: 515-22. doi: 10.1016/j.meegid.2013.05.016.
- Kahl, B. C., Becker, K. & Loffler, B. (2016). Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin Microbiol Rev*, 29 (2): 401-27. doi: 10.1128/CMR.00069-15.
- Kalograiaki, I., Euba, B., Proverbio, D., Campanero-Rhodes, M. A., Aastrup, T., Garmendia, J. & Solis, D. (2016). Combined bacteria microarray and quartz crystal microbalance approach for exploring glycosignatures of nontypeable *Haemophilus influenzae* and recognition by host lectins. *Anal Chem*, 88 (11): 5950-7. doi: 10.1021/acs.analchem.6b00905.
- Karpanoja, P., Nyberg, S. T., Bergman, M., Voipio, T., Paakkari, P., Huovinen, P. & Sarkkinen, H. (2008). Connection between trimethoprim-sulfamethoxazole use and resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52 (7): 2480-5. doi: 10.1128/AAC.01118-07.
- Kaufhold, I., Osbahr, S., Shima, K., Marwitz, S., Rohmann, K., Dromann, D., Goldmann, T., Dalhoff, K. & Rupp, J. (2017). Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) directly interfere with the regulation of E-cadherin in lung epithelial cells. *Microbes Infect*, 19 (11): 560-566. doi: 10.1016/j.micinf.2017.07.002.
- Kawai, T. & Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1143: 1-20. doi: 10.1196/annals.1443.020.
- Kemmer, G., Reilly, T. J., Schmidt-Brauns, J., Zlotnik, G. W., Green, B. A., Fiske, M. J., Herbert,

- M., Kraiss, A., Schlor, S., Smith, A., et al. (2001). NadN and e (P4) are essential for utilization of NAD and nicotinamide mononucleotide but not nicotinamide riboside in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 183 (13): 3974-81. doi: 10.1128/JB.183.13.3974-3981.2001.
- Kenjale, R., Meng, G., Fink, D. L., Juehne, T., Ohashi, T., Erickson, H. P., Waksman, G. & St Geme, J. W., 3rd. (2009). Structural determinants of autoproteolysis of the *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter. *Infect Immun*, 77 (11): 4704-13. doi: 10.1128/IAI.00598-09.
- Ketterer, M. R., Shao, J. Q., Hornick, D. B., Buscher, B., Bandi, V. K. & Apicella, M. A. (1999). Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect Immun*, 67 (8): 4161-70.
- Kew, R. R., Ghebrehiwet, B. & Janoff, A. (1985). Cigarette smoke can activate the alternative pathway of complement *in vitro* by modifying the third component of complement. *J Clin Invest*, 75 (3): 1000-7. doi: 10.1172/JCI111760.
- Khan, A. G., Shouldice, S. R., Kirby, S. D., Yu, R. H., Tari, L. W. & Schryvers, A. B. (2007). High-affinity binding by the periplasmic iron-binding protein from *Haemophilus influenzae* is required for acquiring iron from transferrin. *Biochem J*, 404 (2): 217-25. doi: 10.1042/BJ20070110.
- Kilian, M., Reinholdt, J., Lomholt, H., Poulsen, K. & Frandsen, E. V. (1996). Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS*, 104 (5): 321-38.
- Kim, H. J., Park, Y. D., Moon, U. Y., Kim, J. H., Jeon, J. H., Lee, J. G., Bae, Y. S. & Yoon, J. H. (2008). The role of Nox4 in oxidative stress-induced *MUC5AC* overexpression in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39 (5): 598-609. doi: 10.1165/rcmb.2007-0262OC.
- King, P. (2012). *Haemophilus influenzae* and the lung (*Haemophilus* and the lung). *Clin Transl Med*, 1 (1): 10. doi: 10.1186/2001-1326-1-10.
- Kirby, S. D., Gray-Owen, S. D. & Schryvers, A. B. (1997). Characterization of a ferric-binding protein mutant in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol*, 25 (5): 979-87.
- Kirkman, J. B., Jr. & Crawford, J. J. (1971). Serotyping of noncapsular *Haemophilus influenzae*. *Appl Microbiol*, 22 (1): 133-4.
- Kishore, U., Greenhough, T. J., Waters, P., Shrive, A. K., Ghai, R., Kamran, M. F., Bernal, A. L., Reid, K. B., Madan, T. & Chakraborty, T. (2006). Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol*, 43 (9): 1293-315. doi: 10.1016/j.molimm.2005.08.004.
- Kluchova, Z., Petrasova, D., Joppa, P., Dorkova, Z. & Tkacova, R. (2007). The association between oxidative stress and obstructive lung impairment in patients with COPD. *Physiol Res*, 56 (1): 51-6.
- Koethe, S. M., Nelson, K. E. & Becker, C. G. (1995). Activation of the classical pathway of complement by tobacco glycoprotein (TGP). *J Immunol*, 155 (2): 826-35.
- Kok, M., Buhlmann, E. & Pechere, J. C. (2001). *Salmonella typhimurium thyA* mutants fail to

- grow intracellularly *in vitro* and are attenuated in mice. *Microbiology*, 147 (Pt 3): 727-33. doi: 10.1099/00221287-147-3-727.
- Koo, H. K., Hong, Y., Lim, M. N., Yim, J. J. & Kim, W. J. (2016). Relationship between plasma matrix metalloproteinase levels, pulmonary function, bronchodilator response, and emphysema severity. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 11: 1129-37. doi: 10.2147/COPD.S103281.
- Kosmas, E. N., Zorpidou, D., Vassilareas, V., Roussou, T. & Michaelides, S. (1997). Decreased C4 complement component serum levels correlate with the degree of emphysema in patients with chronic bronchitis. *Chest*, 112 (2): 341-347. doi: DOI 10.1378/chest.112.2.341.
- Koul, P. A., Mir, H., Akram, S., Potdar, V. & Chadha, M. S. (2017). Respiratory viruses in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Lung India*, 34 (1): 29-33. doi: 10.4103/0970-2113.197099.
- Kreisle, R. A. & Parker, C. W. (1983). Specific binding of leukotriene B4 to a receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*, 157 (2): 628-41.
- Krewulak, K. D. & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta*, 1778 (9): 1781-804. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.026.
- Kriegeskorte, A., Block, D., Drescher, M., Windmuller, N., Mellmann, A., Baum, C., Neumann, C., Lore, N. I., Bragonzi, A., Liebau, E., et al. (2014). Inactivation of *thyA* in *Staphylococcus aureus* attenuates virulence and has a strong impact on metabolism and virulence gene expression. *MBio*, 5 (4): e01447-14. doi: 10.1128/mBio.01447-14.
- Kurmi, O. P., Semple, S., Simkhada, P., Smith, W. C. & Ayres, J. G. (2010). COPD and chronic bronchitis risk of indoor air pollution from solid fuel: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*, 65 (3): 221-8. doi: 10.1136/thx.2009.124644.
- Kuroki, Y., Takahashi, M. & Nishitani, C. (2007). Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell Microbiol*, 9 (8): 1871-9. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00953.x.
- Laarmann, S., Cutter, D., Juehne, T., Barenkamp, S. J. & St Geme, J. W. (2002). The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter harbours two adhesive pockets that reside in the passenger domain and recognize the same host cell receptor. *Mol Microbiol*, 46 (3): 731-43.
- LaCross, N. C., Marrs, C. F. & Gilsdorf, J. R. (2014). Otitis media associated polymorphisms in the hemin receptor HemR of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Genet Evol*, 26: 47-57. doi: 10.1016/j.meegid.2014.05.002.
- Lang, M. R., Fiaux, G. W., Gillooly, M., Stewart, J. A., Hulmes, D. J. & Lamb, D. (1994). Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax*, 49 (4): 319-26.
- Langereis, J. D., de Jonge, M. I. & Weiser, J. N. (2014). Binding of human factor H to outer membrane protein P5 of non-typeable *Haemophilus influenzae* contributes to complement resistance. *Mol Microbiol*, 94 (1): 89-106. doi: 10.1111/mmi.12741.

- Langereis, J. D. & Weiser, J. N. (2014). Shielding of a lipooligosaccharide IgM epitope allows evasion of neutrophil-mediated killing of an invasive strain of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *MBio*, 5 (4): e01478-14. doi: 10.1128/mBio.01478-14.
- Laskowski, R. A. & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model*, 51 (10): 2778-86. doi: 10.1021/ci200227u.
- Latunde-Dada, G. O., Takeuchi, K., Simpson, R. J. & McKie, A. T. (2006). Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Lett*, 580 (30): 6865-70. doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.048.
- Laurell, C. B. & Eriksson, S. (1963). Electrophoretic alpha1-globulin pattern of serum in alpha1-antitrypsin deficiency. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 15 (2): 132-&. doi: Doi 10.3109/00365516309051324.
- Lawlor, D. A., Ebrahim, S. & Davey Smith, G. (2004). Association between self-reported childhood socioeconomic position and adult lung function: findings from the British Women's Heart and Health Study. *Thorax*, 59 (3): 199-203.
- Lazaro-Diez, M., Navascues-Lejarza, T., Remuzgo-Martinez, S., Navas, J., Icardo, J. M., Acosta, F., Martinez-Martinez, L. & Ramos-Vivas, J. (2016). *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii* clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells *in vitro*. *Microbes Infect*, 18 (9): 559-64. doi: 10.1016/j.micinf.2016.05.002.
- Leberl, M., Kratzer, A. & Taraseviciene-Stewart, L. (2013). Tobacco smoke induced COPD/emphysema in the animal model-are we all on the same page? *Front Physiol*, 4: 91. doi: 10.3389/fphys.2013.00091.
- Lecaille, F., Lalmanach, G. & Andrault, P. M. (2016). Antimicrobial proteins and peptides in human lung diseases: A friend and foe partnership with host proteases. *Biochimie*, 122: 151-68. doi: 10.1016/j.biochi.2015.08.014.
- Leiberman, A., Leibovitz, E., Piglansky, L., Raiz, S., Press, J., Yagupsky, P. & Dagan, R. (2001). Bacteriologic and clinical efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole for treatment of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*, 20 (3): 260-4.
- Leopold, P. L., O'Mahony, M. J., Lian, X. J., Tilley, A. E., Harvey, B. G. & Crystal, R. G. (2009). Smoking is associated with shortened airway cilia. *PLoS One*, 4 (12): e8157. doi: 10.1371/journal.pone.0008157.
- LeVine, A. M., Whitsett, J. A., Gwozdz, J. A., Richardson, T. R., Fisher, J. H., Burhans, M. S. & Korfhagen, T. R. (2000). Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. *J Immunol*, 165 (7): 3934-40.
- LeVine, A. M. & Whitsett, J. A. (2001). Pulmonary collectins and innate host defense of the lung. *Microbes Infect*, 3 (2): 161-6.
- Li, N., Wang, M., Bramble, L. A., Schmitz, D. A., Schauer, J. J., Sioutas, C., Harkema, J. R. & Nel, A. E. (2009). The adjuvant effect of ambient particulate matter is closely reflected by the par-

ticulate oxidant potential. *Environ Health Perspect*, 117 (7): 1116-23. doi: 10.1289/ehp.0800319.

Li, X. Y., Donaldson, K., Rahman, I. & MacNee, W. (1994). An investigation of the role of glutathione in increased epithelial permeability induced by cigarette smoke *in vivo* and *in vitro*. *Am J Respir Crit Care Med*, 149 (6): 1518-25. doi: 10.1164/ajrccm.149.6.8004308.

Lichtenegger, S., Bina, I., Roier, S., Bauernfeind, S., Keidel, K., Schild, S., Anthony, M. & Reidl, J. (2014). Characterization of lactate utilization and its implication on the physiology of *Haemophilus influenzae*. *Int J Med Microbiol*, 304 (3-4): 490-8. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.02.010.

Lichtenegger, S., Bina, I., Durakovic, S., Glaser, P., Tutz, S., Schild, S. & Reidl, J. (2017). Serum resistance and phase variation of a nasopharyngeal non-typeable *Haemophilus influenzae* isolate. *Int J Med Microbiol*, 307 (2): 139-146. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.01.005.

Liu, X., Yang, T., Sun, T. & Shao, K. (2017). SIRT1 mediated regulation of oxidative stress induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides in human alveolar epithelial cells. *Mol Med Rep*, 15 (2): 813-818. doi: 10.3892/mmr.2016.6045.

Liu, Y., Lee, K., Perez-Padilla, R., Hudson, N. L. & Mannino, D. M. (2008). Outdoor and indoor air pollution and COPD-related diseases in high- and low-income countries. *Int J Tuberc Lung Dis*, 12 (2): 115-27.

Loeb, M. R. (1995). Ferrochelatase activity and protoporphyrin IX utilization in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 177 (12): 3613-5.

Loffek, S., Schilling, O. & Franzke, C. W. (2011). Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*, 38 (1): 191-208. doi: 10.1183/09031936.00146510.

Lopez, C. A. & Skaar, E. P. (2018). The impact of dietary transition metals on host-bacterial interactions. *Cell Host Microbe*, 23 (6): 737-748. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.008.

Lopez-Gomez, A., Cano, V., Moranta, D., Morey, P., Garcia del Portillo, F., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. (2012). Host cell kinases, alpha5 and beta1 integrins, and Rac1 signalling on the microtubule cytoskeleton are important for non-typeable *Haemophilus influenzae* invasion of respiratory epithelial cells. *Microbiology*, 158 (Pt 9): 2384-98. doi: 10.1099/mic.0.059972-0.

Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153 (6): 1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

Louhelainen, N., Ryttila, P., Haahtela, T., Kinnula, V. L. & Djukanovic, R. (2009). Persistence of oxidant and protease burden in the airways after smoking cessation. *BMC Pulm Med*, 9: 25. doi: 10.1186/1471-2466-9-25.

Lugade, A. A., Vethanayagam, R. R., Nasirikenari, M., Bogner, P. N., Segal, B. H. & Thanavala, Y. (2011). Nrf2 regulates chronic lung inflammation and B-cell responses to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45 (3): 557-65. doi: 10.1165/rcmb.2010-0321OC.

Lysenko, E. S., Gould, J., Bals, R., Wilson, J. M. & Weiser, J. N. (2000a). Bacterial phosphor-

- ylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun*, 68 (3): 1664-71.
- Lysenko, E. S., Richards, J. C., Cox, A. D., Stewart, A., Martin, A., Kapoor, M. & Weiser, J. N. (2000b). The position of phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* affects binding and sensitivity to C-reactive protein-mediated killing. *Mol Microbiol*, 35 (1): 234-45.
- Maciver, I. & Hansen, E. J. (1996). Lack of expression of the global regulator OxyR in *Haemophilus influenzae* has a profound effect on growth phenotype. *Infect Immun*, 64 (11): 4618-29.
- Macfadyen, L. P., Ma, C. & Redfield, R. J. (1998). A 3',5' cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase modulates cAMP levels and optimizes competence in *Haemophilus influenzae* Rd. *J Bacteriol*, 180 (17): 4401-5.
- Mackay, A. J. & Hurst, J. R. (2013). COPD exacerbations: causes, prevention, and treatment. *Immunol Allergy Clin North Am*, 33 (1): 95-115. doi: 10.1016/j.iac.2012.10.006.
- Maina, J. N. (2000). Comparative respiratory morphology: themes and principles in the design and construction of the gas exchangers. *Anat Rec*, 261 (1): 25-44.
- Malhotra, D., Thimmulappa, R., Viji, N., Navas-Acien, A., Sussan, T., Merali, S., Zhang, L., Kelsen, S. G., Myers, A., Wise, R., et al. (2009). Heightened endoplasmic reticulum stress in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the role of Nrf2-regulated proteasomal activity. *Am J Respir Crit Care Med*, 180 (12): 1196-207. doi: 10.1164/rccm.200903-0324OC.
- Malhotra, S., Deshmukh, S. S. & Dastidar, S. G. (2012). COX inhibitors for airway inflammation. *Expert Opin Ther Targets*, 16 (2): 195-207. doi: 10.1517/14728222.2012.661416.
- Mammen, M. J. & Sethi, S. (2016). COPD and the microbiome. *Respirology*, 21 (4): 590-9. doi: 10.1111/resp.12732.
- Man, W. H., de Steenhuijsen Pijters, W. A. & Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol*, 15 (5): 259-270. doi: 10.1038/nrmicro.2017.14.
- Mannam, P., Rauniyar, N., Lam, T. T., Luo, R., Lee, P. J. & Srivastava, A. (2016). MKK3 influences mitophagy and is involved in cigarette smoke-induced inflammation. *Free Radic Biol Med*, 101: 102-115. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.001.
- Mansour, S. C., Pena, O. M. & Hancock, R. E. (2014). Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol*, 35 (9): 443-50. doi: 10.1016/j.it.2014.07.004.
- Mansson, M., Hood, D. W., Moxon, E. R. & Schweda, E. K. (2003). Structural diversity in lipopolysaccharide expression in nontypeable *Haemophilus influenzae*. Identification of L-glycerol-D-manno-heptose in the outer-core region in three clinical isolates. *Eur J Biochem*, 270 (4): 610-24.

- Mansson, V., Skaare, D., Riesbeck, K. & Resman, F. (2017). The spread and clinical impact of ST14CC-PBP3 type IIb/A, a clonal group of non-typeable *Haemophilus influenzae* with chromosomally mediated beta-lactam resistance—a prospective observational study. *Clin Microbiol Infect*, 23 (3): 209 e1-209 e7. doi: 10.1016/j.cmi.2016.11.006.
- Marc, M. M., Korosec, P., Kosnik, M., Kern, I., Flezar, M., Suskovic, S. & Sorli, J. (2004). Complement factors c3a, c4a, and c5a in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31 (2): 216-9. doi: 10.1165/rcmb.2003-0394OC.
- Marti, S., Puig, C., Merlos, A., Vinas, M., de Jonge, M. I., Linares, J., Ardanuy, C. & Langereis, J. D. (2017). Bacterial lysis through interference with peptidoglycan synthesis increases biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *mSphere*, 2 (1). doi: 10.1128/mSphere.00329-16.
- Marti-Llitas, P., Regueiro, V., Morey, P., Hood, D. W., Saus, C., Sauleda, J., Agusti, A. G., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. (2009). Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun*, 77 (10): 4232-42. doi: 10.1128/IAI.00305-09.
- Marti-Llitas, P., Lopez-Gomez, A., Mauro, S., Hood, D. W., Viadas, C., Calatayud, L., Morey, P., Servin, A., Linares, J., Oliver, A., et al. (2011). Nontypeable *Haemophilus influenzae* displays a prevalent surface structure molecular pattern in clinical isolates. *PLoS One*, 6 (6): e21133. doi: 10.1371/journal.pone.0021133.
- Martin, T. R. & Frevert, C. W. (2005). Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc*, 2 (5): 403-11. doi: 10.1513/pats.200508-090JS.
- Martinez, F. J., Foster, G., Curtis, J. L., Criner, G., Weinmann, G., Fishman, A., DeCamp, M. M., Benditt, J., Scieurba, F., Make, B., et al. (2006). Predictors of mortality in patients with emphysema and severe airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*, 173 (12): 1326-34. doi: 10.1164/rccm.200510-1677OC.
- Martinez-Rivera, C., Portillo, K., Munoz-Ferrer, A., Martinez-Ortiz, M. L., Molins, E., Serra, P., Ruiz-Manzano, J. & Morera, J. (2012). Anemia is a mortality predictor in hospitalized patients for COPD exacerbation. *COPD*, 9 (3): 243-50. doi: 10.3109/15412555.2011.647131.
- Mason, K. M., Munson, R. S., Jr. & Bakaletz, L. O. (2003). Nontypeable *Haemophilus influenzae* gene expression induced *in vivo* in a chinchilla model of otitis media. *Infect Immun*, 71 (6): 3454-62.
- Mason, K. M., Munson, R. S., Jr. & Bakaletz, L. O. (2005). A mutation in the *sap* operon attenuates survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in a chinchilla model of otitis media. *Infect Immun*, 73 (1): 599-608. doi: 10.1128/IAI.73.1.599-608.2005.
- Mason, K. M., Bruggeman, M. E., Munson, R. S. & Bakaletz, L. O. (2006). The non-typeable *Haemophilus influenzae* Sap transporter provides a mechanism of antimicrobial peptide resistance and SapD-dependent potassium acquisition. *Mol Microbiol*, 62 (5): 1357-72. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05460.x.
- Mason, K. M., Raffel, F. K., Ray, W. C. & Bakaletz, L. O. (2011). Heme utilization by nontype-

- able *Haemophilus influenzae* is essential and dependent on Sap transporter function. *J Bacteriol*, 193 (10): 2527-35. doi: 10.1128/JB.01313-10.
- Mason, R. J., Greene, K. & Voelker, D. R. (1998). Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am J Physiol*, 275 (1 Pt 1): L1-13.
- Mason, R. J. (2006). Biology of alveolar type II cells. *Respirology*, 11 Suppl: S12-5. doi: 10.1111/j.1440-1843.2006.00800.x.
- Masoud, H., Moxon, E. R., Martin, A., Krajcarski, D. & Richards, J. C. (1997). Structure of the variable and conserved lipopolysaccharide oligosaccharide epitopes expressed by *Haemophilus influenzae* serotype b strain Eagan. *Biochemistry*, 36 (8): 2091-103. doi: 10.1021/bi961989y.
- Masoud, H., Uhrin, D., Moxon, E. R. & Richards, J. C. (2008). Identification of a novel structural motif in the lipopolysaccharide of the *galE/galK* double mutant of *Haemophilus influenzae* strain Eagan. *Carbohydr Res*, 343 (16): 2763-70. doi: 10.1016/j.carres.2008.04.027.
- Maughan, H. & Redfield, R. J. (2009). Extensive variation in natural competence in *Haemophilus influenzae*. *Evolution*, 63 (7): 1852-66. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00658.x.
- Mell, J. C., Shumilina, S., Hall, I. M. & Redfield, R. J. (2011). Transformation of natural genetic variation into *Haemophilus influenzae* genomes. *PLoS Pathog*, 7 (7): e1002151. doi: 10.1371/journal.ppat.1002151.
- Mell, J. C., Hall, I. M. & Redfield, R. J. (2012). Defining the DNA uptake specificity of naturally competent *Haemophilus influenzae* cells. *Nucleic Acids Res*, 40 (17): 8536-49. doi: 10.1093/nar/gks640.
- Mell, J. C., Sinha, S., Balashov, S., Viadas, C., Grassa, C. J., Ehrlich, G. D., Nislow, C., Redfield, R. J. & Garmendia, J. (2014). Complete genome sequence of *Haemophilus influenzae* strain 375 from the middle ear of a pediatric patient with otitis media. *Genome Announc*, 2 (6). doi: 10.1128/genomeA.01245-14.
- Mell, J. C., Viadas, C., Molerés, J., Sinha, S., Fernandez-Calvet, A., Porsch, E. A., St Geme, J. W., 3rd, Nislow, C., Redfield, R. J. & Garmendia, J. (2016). Transformed recombinant enrichment profiling rapidly identifies HMW1 as an intracellular invasion locus in *Haemophilus influenzae*. *PLoS Pathog*, 12 (4): e1005576. doi: 10.1371/journal.ppat.1005576.
- Meng, G., Spahich, N., Kenjale, R., Waksman, G. & St Geme, J. W., 3rd. (2011). Crystal structure of the *Haemophilus influenzae* Hap adhesin reveals an intercellular oligomerization mechanism for bacterial aggregation. *EMBO J*, 30 (18): 3864-74. doi: 10.1038/emboj.2011.279.
- Meyer, P. A., Socias, S., Key, J., Ransey, E., Tjon, E. C., Buschiazzi, A., Lei, M., Botka, C., Withrow, J., Neau, D., et al. (2016). Data publication with the structural biology data grid supports live analysis. *Nat Commun*, 7: 10882. doi: 10.1038/ncomms10882.
- Mikko, M., Forsslund, H., Cui, L., Grunewald, J., Wheelock, A. M., Wahlstrom, J. & Skold, C. M. (2013). Increased intraepithelial (CD103+) CD8+ T cells in the airways of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Immunobiology*, 218 (2): 225-31. doi: 10.1016/j.

imbio.2012.04.012.

Mingarro, I., Lukovic, D., Vilar, M. & Perez-Gil, J. (2008). Synthetic pulmonary surfactant preparations: new developments and future trends. *Curr Med Chem*, 15 (4): 393-403.

Miyabara, Y., Ichinose, T., Takano, H., Lim, H. B. & Sagai, M. (1998). Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 102 (5): 805-12.

Mohd-Zain, Z., Kamsani, N. H., Ismail, I. S. & Ahmad, N. (2012). Antibiotic susceptibility profile of *Haemophilus influenzae* and transfer of cotrimoxazole resistance determinants. *Trop Biomed*, 29 (3): 372-80.

Moleres, J., Fernández-Calvet, A., Ehrlich, R.L., Martí, S., Pérez-Regidor, L., Euba, B., Rodríguez-Arce, I., Balashov, S., Cuevas, E., Liñares, J., Ardanuy, C., Martín-Santamaría, S., Ehrlich, G. D., Mell, J. C. & Garmendia, J. Antagonistic pleiotropy in the bifunctional surface protein FadL (OmpP1) during adaptation of *Haemophilus influenzae* to chronic lung infection associated with chronic obstructive pulmonary Disease. *MBio*, 9:e01176-18. doi: 10.1128/mBio.01176-18.

Monso, E., Ruiz, J., Rosell, A., Manterola, J., Fiz, J., Morera, J. & Ausina, V. (1995). Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med*, 152 (4 Pt 1): 1316-20. doi: 10.1164/ajrcm.152.4.7551388.

Morey, P., Cano, V., Martí-Llitas, P., Lopez-Gomez, A., Regueiro, V., Saus, C., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. (2011). Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypeable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology*, 157 (Pt 1): 234-50. doi: 10.1099/mic.0.040451-0.

Morey, P., Viadas, C., Euba, B., Hood, D. W., Barberan, M., Gil, C., Grillo, M. J., Bengoechea, J. A. & Garmendia, J. (2013). Relative contributions of lipooligosaccharide inner and outer core modifications to nontypeable *Haemophilus influenzae* pathogenesis. *Infect Immun*, 81 (11): 4100-11. doi: 10.1128/IAI.00492-13.

Morris, D., Kurasany, M., Nguyen, T., Kim, J., Guilford, F., Mehta, R., Gray, D., Saviola, B. & Venketaraman, V. (2013). Glutathione and infection. *Biochim Biophys Acta*, 1830 (5): 3329-49. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.012.

Morton, D. J. & Stull, T. L. (1999). Distribution of a family of *Haemophilus influenzae* genes containing CCAA nucleotide repeating units. *FEMS Microbiol Lett*, 174 (2): 303-9.

Morton, D. J., Smith, A., Ren, Z., Madore, L. L., VanWagoner, T. M., Seale, T. W., Whitby, P. W. & Stull, T. L. (2004). Identification of a haem-utilization protein (Hup) in *Haemophilus influenzae*. *Microbiology*, 150 (Pt 12): 3923-33. doi: 10.1099/mic.0.27238-0.

Morton, D. J., Seale, T. W., Madore, L. L., VanWagoner, T. M., Whitby, P. W. & Stull, T. L. (2007a). The haem-haemopexin utilization gene cluster (*hxuCBA*) as a virulence factor of *Haemophilus influenzae*. *Microbiology*, 153 (Pt 1): 215-24. doi: 10.1099/mic.0.2006/000190-0.

- Morton, D. J., Smith, A., VanWagoner, T. M., Seale, T. W., Whitby, P. W. & Stull, T. L. (2007b). Lipoprotein e (P4) of *Haemophilus influenzae*: role in heme utilization and pathogenesis. *Microbes Infect*, 9 (8): 932-9. doi: 10.1016/j.micinf.2007.03.013.
- Morton, D. J., Seale, T. W., Bakaletz, L. O., Jurcisek, J. A., Smith, A., VanWagoner, T. M., Whitby, P. W. & Stull, T. L. (2009a). The heme-binding protein (HbpA) of *Haemophilus influenzae* as a virulence determinant. *Int J Med Microbiol*, 299 (7): 479-88. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.03.004.
- Morton, D. J., Seale, T. W., Vanwagoner, T. M., Whitby, P. W. & Stull, T. L. (2009b). The *dp-pBCDF* gene cluster of *Haemophilus influenzae*: Role in heme utilization. *BMC Res Notes*, 2: 166. doi: 10.1186/1756-0500-2-166.
- Moxon, E. R., Rainey, P. B., Nowak, M. A. & Lenski, R. E. (1994). Adaptive evolution of highly mutable *loci* in pathogenic bacteria. *Curr Biol*, 4 (1): 24-33.
- Moxon, R., Bayliss, C. & Hood, D. (2006). Bacterial contingency *loci*: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation. *Annu Rev Genet*, 40: 307-33. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090442.
- Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Hentze, M. W. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr*, 28: 197-213. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521.
- Muller, K. C., Welker, L., Paasch, K., Feindt, B., Erpenbeck, V. J., Hohlfeld, J. M., Krug, N., Nakashima, M., Branscheid, D., Magnussen, H., et al. (2006). Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence *in vitro*. *Respir Res*, 7: 32. doi: 10.1186/1465-9921-7-32.
- Mulugeta, S. & Beers, M. F. (2006). Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. *Microbes Infect*, 8 (8): 2317-23. doi: 10.1016/j.micinf.2006.04.009.
- Munoz-Barrutia, A., Ceresa, M., Artaechevarria, X., Montuenga, L. M. & Ortiz-de-Solorzano, C. (2012). Quantification of lung damage in an elastase-induced mouse model of emphysema. *Int J Biomed Imaging*, 2012: 734734. doi: 10.1155/2012/734734.
- Murphy, T. F. & Sethi, S. (1992). Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*, 146 (4): 1067-83. doi: 10.1164/ajrccm/146.4.1067.
- Murphy, T. F., Brauer, A. L., Schiffmacher, A. T. & Sethi, S. (2004). Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 170 (3): 266-72. doi: 10.1164/rccm.200403-354OC.
- Murphy, T. F. & Brauer, A. L. (2011). Expression of urease by *Haemophilus influenzae* during human respiratory tract infection and role in survival in an acid environment. *BMC Microbiol*, 11: 183. doi: 10.1186/1471-2180-11-183.
- Murphy, T. F., Kirkham, C., Gallo, M. C., Yang, Y., Wilding, G. E. & Pettigrew, M. M. (2017). Immunoglobulin A protease variants facilitate intracellular survival in epithelial cells by nontype-

able *Haemophilus influenzae* that persist in the human respiratory tract in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis*, 216 (10): 1295-1302. doi: 10.1093/infdis/jix471.

Naito, M. (2008). Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathol Int*, 58 (3): 143-55. doi: 10.1111/j.1440-1827.2007.02203.x.

Nakamura, S., Shchepetov, M., Dalia, A. B., Clark, S. E., Murphy, T. F., Sethi, S., Gilsdorf, J. R., Smith, A. L. & Weiser, J. N. (2011). Molecular basis of increased serum resistance among pulmonary isolates of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *PLoS Pathog*, 7 (1): e1001247. doi: 10.1371/journal.ppat.1001247.

Neilson, L., Blakely, G. & Sherratt, D. J. (1999). Site-specific recombination at dif by *Haemophilus influenzae* XerC. *Mol Microbiol*, 31 (3): 915-26.

Neumann, A., Berends, E. T., Nerlich, A., Molhoek, E. M., Gallo, R. L., Meerloo, T., Nizet, V., Naim, H. Y. & von Kockritz-Blickwede, M. (2014a). The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem J*, 464 (1): 3-11. doi: 10.1042/BJ20140778.

Neumann, A., Vollger, L., Berends, E. T., Molhoek, E. M., Stapels, D. A., Midon, M., Friaes, A., Pingoud, A., Rooijackers, S. H., Gallo, R. L., et al. (2014b). Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J Innate Immun*, 6 (6): 860-8. doi: 10.1159/000363699.

Nichols, W. A., Gibson, B. W., Melaugh, W., Lee, N. G., Sunshine, M. & Apicella, M. A. (1997). Identification of the ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase (*rfaD*) and heptosyltransferase II (*rfaF*) biosynthesis genes from nontypeable *Haemophilus influenzae* 2019. *Infect Immun*, 65 (4): 1377-86.

Noel, G. J., Love, D. C. & Mosser, D. M. (1994). High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate bacterial adhesion to cellular proteoglycans. *Infect Immun*, 62 (9): 4028-33.

Notredame, C., Higgins, D. G. & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*, 302 (1): 205-17. doi: 10.1006/jmbi.2000.4042.

Novotny, L. A. & Bakaletz, L. O. (2016). Intercellular adhesion molecule 1 serves as a primary cognate receptor for the Type IV pilus of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Cell Microbiol*, 18 (8): 1043-55. doi: 10.1111/cmi.12575.

O'Byrne P, M. & Postma, D. S. (1999). The many faces of airway inflammation. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Asthma Research Group. *Am J Respir Crit Care Med*, 159 (5 Pt 2): S41-63.

O'Dwyer, D. N., Gurczynski, S. J. & Moore, B. B. (2018). Pulmonary immunity and extracellular matrix interactions. *Matrix Biol*. doi: 10.1016/j.matbio.2018.04.003.

O'Reilly, P. J., Hardison, M. T., Jackson, P. L., Xu, X., Snelgrove, R. J., Gaggar, A., Galin, F. S. & Blalock, J. E. (2009). Neutrophils contain prolyl endopeptidase and generate the chemotactic pep-

- tide, PGP, from collagen. *J Neuroimmunol*, 217 (1-2): 51-4. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.09.020.
- Oliver, A. & Mena, A. (2010). Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect*, 16 (7): 798-808. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03250.x.
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J. N., Siebert, R., Baron, R. M., Kasper, D. L., et al. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*, 336 (6080): 489-93. doi: 10.1126/science.1219328.
- Osman, K. L., Jefferies, J. M., Woelk, C. H., Cleary, D. W. & Clarke, S. C. (2018). The adhesins of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 16 (3): 187-196. doi: 10.1080/14787210.2018.1438263.
- Othman, D. S., Schirra, H., McEwan, A. G. & Kappler, U. (2014). Metabolic versatility in *Haemophilus influenzae*: a metabolomic and genomic analysis. *Front Microbiol*, 5: 69. doi: 10.3389/fmicb.2014.00069.
- Overbeek, S. A., Braber, S., Koelink, P. J., Henricks, P. A., Mortaz, E., LoTam Loi, A. T., Jackson, P. L., Garssen, J., Wagenaar, G. T., Timens, W., et al. (2013). Cigarette smoke-induced collagen destruction; key to chronic neutrophilic airway inflammation? *PLoS One*, 8 (1): e55612. doi: 10.1371/journal.pone.0055612.
- Owen, C. A. (2005). Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2 (4): 373-85; discussion 394-5. doi: 10.1513/pats.200504-029SR.
- Panek, H. & O'Brian, M. R. (2002). A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology*, 148 (Pt 8): 2273-82. doi: 10.1099/00221287-148-8-2273.
- Pang, B., Hong, W., West-Barnette, S. L., Kock, N. D. & Swords, W. E. (2008). Diminished ICAM-1 expression and impaired pulmonary clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease/emphysema. *Infect Immun*, 76 (11): 4959-67. doi: 10.1128/IAI.00664-08.
- Pang, B., Hong, W., Kock, N. D. & Swords, W. E. (2012). Dps promotes survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in biofilm communities *in vitro* and resistance to clearance *in vivo*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 58. doi: 10.3389/fcimb.2012.00058.
- Parameswaran, G. I., Sethi, S. & Murphy, T. F. (2011). Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD. *Chest*, 140 (3): 611-617. doi: 10.1378/chest.10-2760.
- Park, J. W., Shin, I. S., Ha, U. H., Oh, S. R., Kim, J. H. & Ahn, K. S. (2015). Pathophysiological changes induced by *Pseudomonas aeruginosa* infection are involved in MMP-12 and MMP-13 upregulation in human carcinoma epithelial cells and a pneumonia mouse model. *Infect Immun*, 83 (12): 4791-9. doi: 10.1128/iai.00619-15.
- Peltola, H. (2000). Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev*, 13 (2): 302-17.

- Pera, T., Zuidhof, A., Valadas, J., Smit, M., Schoemaker, R. G., Gosens, R., Maarsingh, H., Zaagsma, J. & Meurs, H. (2011). Tiotropium inhibits pulmonary inflammation and remodelling in a guinea pig model of COPD. *Eur Respir J*, 38 (4): 789-96. doi: 10.1183/09031936.00146610.
- Perez, B. F., Mendez, G. A., Lagos, R. A. & Vargas, M. S. (2014). Mucociliary clearance system in lung defense. *Rev Med Chil*, 142 (5): 606-15. doi: 10.4067/S0034-98872014000500009.
- Perez-Rial, S., Del Puerto-Nevado, L., Gonzalez-Mangado, N. & Peces-Barba, G. (2011). Early detection of susceptibility to acute lung inflammation by molecular imaging in mice exposed to cigarette smoke. *Mol Imaging*, 10 (5): 398-405. doi: 10.2310/7290.2011.00010.
- Pettigrew, M. M., Ahearn, C. P., Gent, J. F., Kong, Y., Gallo, M. C., Munro, J. B., D’Mello, A., Sethi, S., Tettelin, H. & Murphy, T. F. (2018). *Haemophilus influenzae* genome evolution during persistence in the human airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi: 10.1073/pnas.1719654115.
- Pfundt, R., Wingens, M., Bergers, M., Zweers, M., Frenken, M. & Schalkwijk, J. (2000). TNF-alpha and serum induce SKALP/elafin gene expression in human keratinocytes by a p38 MAP kinase-dependent pathway. *Arch Dermatol Res*, 292 (4): 180-7.
- Philippot, Q., Deslee, G., Adair-Kirk, T. L., Woods, J. C., Byers, D., Conradi, S., Dury, S., Perotin, J. M., Lebargy, F., Cassan, C., et al. (2014). Increased iron sequestration in alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*, 9 (5): e96285. doi: 10.1371/journal.pone.0096285.
- Pillai, S. G., Ge, D., Zhu, G., Kong, X., Shianna, K. V., Need, A. C., Feng, S., Hersh, C. P., Bakke, P., Gulsvik, A., et al. (2009). A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet*, 5 (3): e1000421. doi: 10.1371/journal.pgen.1000421.
- Platt, D. J., Guthrie, A. J. & Langan, C. E. (1983). The isolation of thymidine-requiring *Haemophilus influenzae* from the sputum of chronic bronchitic patients receiving trimethoprim. *J Antimicrob Chemother*, 11 (3): 281-6.
- Pniewska, E. & Pawliczak, R. (2013). The involvement of phospholipases A2 in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Mediators Inflamm*, 2013: 793505. doi: 10.1155/2013/793505.
- Poole, P. J., Chacko, E., Wood-Baker, R. W. & Cates, C. J. (2006). Influenza vaccine for patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD002733. doi: 10.1002/14651858.CD002733.pub2.
- Post, J. C. (2001). Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope*, 111 (12): 2083-94. doi: 10.1097/00005537-200112000-00001.
- Power, P. M., Sweetman, W. A., Gallacher, N. J., Woodhall, M. R., Kumar, G. A., Moxon, E. R. & Hood, D. W. (2009). Simple sequence repeats in *Haemophilus influenzae*. *Infect Genet Evol*, 9 (2): 216-28. doi: 10.1016/j.meegid.2008.11.006.
- Pragman, A. A., Kim, H. B., Reilly, C. S., Wendt, C. & Isaacson, R. E. (2012). The lung microbi-

- ome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*, 7 (10): e47305. doi: 10.1371/journal.pone.0047305.
- Pragman, A. A., Lyu, T., Baller, J. A., Gould, T. J., Kelly, R. F., Reilly, C. S., Isaacson, R. E. & Wendt, C. H. (2018). The lung tissue microbiota of mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Microbiome*, 6 (1): 7. doi: 10.1186/s40168-017-0381-4.
- Prasadarao, N. V., Lysenko, E., Wass, C. A., Kim, K. S. & Weiser, J. N. (1999). Opacity-associated protein A contributes to the binding of *Haemophilus influenzae* to chag epithelial cells. *Infect Immun*, 67 (8): 4153-60.
- Puig, C., Grau, I., Marti, S., Tubau, F., Calatayud, L., Pallares, R., Linares, J. & Ardanuy, C. (2014). Clinical and molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease in adult patients. *PLoS One*, 9 (11): e112711. doi: 10.1371/journal.pone.0112711.
- Punturieri, A., Filippov, S., Allen, E., Caras, I., Murray, R., Reddy, V. & Weiss, S. J. (2000). Regulation of elastinolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med*, 192 (6): 789-99.
- Qu, J., Lesse, A. J., Brauer, A. L., Cao, J., Gill, S. R. & Murphy, T. F. (2010). Proteomic expression profiling of *Haemophilus influenzae* grown in pooled human sputum from adults with chronic obstructive pulmonary disease reveal antioxidant and stress responses. *BMC Microbiol*, 10: 162. doi: 10.1186/1471-2180-10-162.
- Quanjer, P. H., Stanojevic, S., Stocks, J., Hall, G. L., Prasad, K. V., Cole, T. J., Rosenthal, M., Perez-Padilla, R., Hankinson, J. L., Falaschetti, E., et al. (2010). Changes in the FEV(1)/FVC ratio during childhood and adolescence: an intercontinental study. *Eur Respir J*, 36 (6): 1391-9. doi: 10.1183/09031936.00164109.
- Quanjer, P. H., Hall, G. L., Stanojevic, S., Cole, T. J., Stocks, J. & Global Lungs, I. (2012). Age- and height-based prediction bias in spirometry reference equations. *Eur Respir J*, 40 (1): 190-7. doi: 10.1183/09031936.00161011.
- Raffel, F. K., Szelestey, B. R., Beatty, W. L. & Mason, K. M. (2013). The *Haemophilus influenzae* Sap transporter mediates bacterium-epithelial cell homeostasis. *Infect Immun*, 81 (1): 43-54. doi: 10.1128/IAI.00942-12.
- Rajagopal, A., Rao, A. U., Amigo, J., Tian, M., Upadhyay, S. K., Hall, C., Uhm, S., Mathew, M. K., Fleming, M. D., Paw, B. H., et al. (2008). Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*, 453 (7198): 1127-31. doi: 10.1038/nature06934.
- Rajendrasozhan, S., Yang, S. R., Kinnula, V. L. & Rahman, I. (2008). SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 177 (8): 861-70. doi: 10.1164/rccm.200708-1269OC.
- Ramadas, R. A., Wu, L. & LeVine, A. M. (2009). Surfactant protein A enhances production of secretory leukoprotease inhibitor and protects it from cleavage by matrix metalloproteinases. *J Immunol*, 182 (3): 1560-7.

- Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., Campuzano, S., Moscoso, M., Gonzalez-Camacho, F., Domenech, M., Rodriguez de Cordoba, S., Sanchez-Madrid, F., Brown, J. S., Garcia, E., et al. (2015). Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infect Immun*, 83 (2): 591-603. doi: 10.1128/IAI.02811-14.
- Rao, V. K., Krasan, G. P., Hendrixson, D. R., Dawid, S. & St Geme, J. W., 3rd. (1999). Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev*, 23 (2): 99-129.
- Ravi, A. K., Khurana, S., Lemon, J., Plumb, J., Booth, G., Healy, L., Catley, M., Vestbo, J. & Singh, D. (2014). Increased levels of soluble interleukin-6 receptor and CCL3 in COPD sputum. *Respir Res*, 15: 103. doi: 10.1186/s12931-014-0103-4.
- Reddy, M. S., Bernstein, J. M., Murphy, T. F. & Faden, H. S. (1996). Binding between outer membrane proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin. *Infect Immun*, 64 (4): 1477-9.
- Reddy, M. S., Murphy, T. F., Faden, H. S. & Bernstein, J. M. (1997). Middle ear mucin glycoprotein: purification and interaction with nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 116 (2): 175-80. doi: 10.1016/S0194-59989770321-8.
- Reddy, N. M., Suryanarayana, V., Kalvakolanu, D. V., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Hassoun, P. M., Kleeberger, S. R. & Reddy, S. P. (2009). Innate immunity against bacterial infection following hyperoxia exposure is impaired in NRF2-deficient mice. *J Immunol*, 183 (7): 4601-8. doi: 10.4049/jimmunol.0901754.
- Regueiro, V., Moranta, D., Frank, C. G., Larrarte, E., Margareto, J., March, C., Garmendia, J. & Bengoechea, J. A. (2011). *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. *Cell Microbiol*, 13 (1): 135-53. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01526.x
- Reid, L. (1960). Measurement of the bronchial mucous gland layer: a diagnostic yardstick in chronic bronchitis. *Thorax*, 15: 132-41.
- Reidl, J. & Mekalanos, J. J. (1996). Lipoprotein e(P4) is essential for hemin uptake by *Haemophilus influenzae*. *J Exp Med*, 183 (2): 621-9.
- Reilly, I. A., Knapp, H. R. & Fitzgerald, G. A. (1988). Leukotriene B4 synthesis and neutrophil chemotaxis in chronic granulocytic leukaemia. *J Clin Pathol*, 41 (11): 1163-7.
- Remuzgo-Martinez, S., Lazaro-Diez, M., Mayer, C., Aranzamendi-Zaldumbide, M., Padilla, D., Calvo, J., Marco, F., Martinez-Martinez, L., Icardo, J. M., Otero, A. & Ramos-Vivas, J. (2015). Biofilm formation and quorum-sensing-molecule production by clinical isolates of *Serratia liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 81 (10): 3306-15. doi: 10.1128/AEM.00088-15.
- Ren, D., Nelson, K. L., Uchakin, P. N., Smith, A. L., Gu, X. X. & Daines, D. A. (2012). Characterization of extended co-culture of non-typeable *Haemophilus influenzae* with primary human respiratory tissues. *Exp Biol Med (Maywood)*, 237 (5): 540-7. doi: 10.1258/ebm.2012.011377.

- Ren, Z., Jin, H., Morton, D. J. & Stull, T. L. (1998). *hgpB*, a gene encoding a second *Haemophilus influenzae* hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding protein. *Infect Immun*, 66 (10): 4733-41.
- Repapi, E., Sayers, I., Wain, L. V., Burton, P. R., Johnson, T., Obeidat, M., Zhao, J. H., Ramasamy, A., Zhai, G., Vitart, V., et al. (2010). Genome-wide association study identifies five *loci* associated with lung function. *Nat Genet*, 42 (1): 36-44. doi: 10.1038/ng.501.
- Reznik, G. K. (1990). Comparative anatomy, physiology, and function of the upper respiratory tract. *Environ Health Perspect*, 85: 171-6.
- Richards, J. C., Cox, A. D., Schweda, E. K., Martin, A., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (2001). Structure and functional genomics of lipopolysaccharide expression in *Haemophilus influenzae*. *Adv Exp Med Biol*, 491: 515-24.
- Robert, X. & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res*, 42 (Web Server issue): W320-4. doi: 10.1093/nar/gku316.
- Rodriguez-Arce, I., Marti, S., Euba, B., Fernandez-Calvet, A., Moleres, J., Lopez-Lopez, N., Barberan, M., Ramos-Vivas, J., Tubau, F., Losa, C., et al. (2017). Inactivation of the thymidylate synthase *thyA* in non-typeable *Haemophilus influenzae* modulates antibiotic resistance and has a strong impact on its interplay with the host airways. *Front Cell Infect Microbiol*, 7: 266. doi: 10.3389/fcimb.2017.00266.
- Rohde, G., Wiethege, A., Borg, I., Kauth, M., Bauer, T. T., Gillissen, A., Bufe, A. & Schultze-Werninghaus, G. (2003). Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax*, 58 (1): 37-42.
- Roier, S., Blume, T., Klug, L., Wagner, G. E., Elhenawy, W., Zangger, K., Prassl, R., Reidl, J., Daum, G., Feldman, M. F., et al. (2015). A basis for vaccine development: Comparative characterization of *Haemophilus influenzae* outer membrane vesicles. *Int J Med Microbiol*, 305 (3): 298-309. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.12.005.
- Roman, F., Canton, R., Perez-Vazquez, M., Baquero, F. & Campos, J. (2004). Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol*, 42 (4): 1450-9.
- Ronander, E., Brant, M., Janson, H., Sheldon, J., Forsgren, A. & Riesbeck, K. (2008). Identification of a novel *Haemophilus influenzae* protein important for adhesion to epithelial cells. *Microbes Infect*, 10 (1): 87-96. doi: 10.1016/j.micinf.2007.10.006.
- Ronander, E., Brant, M., Eriksson, E., Morgelin, M., Hallgren, O., Westergren-Thorsson, G., Forsgren, A. & Riesbeck, K. (2009). Nontypeable *Haemophilus influenzae* adhesin protein E: characterization and biological activity. *J Infect Dis*, 199 (4): 522-31. doi: 10.1086/596211.
- Rooney, S. A., Young, S. L. & Mendelson, C. R. (1994). Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J*, 8 (12): 957-67.
- Rosadini, C. V., Gawronski, J. D., Raimunda, D., Arguello, J. M. & Akerley, B. J. (2011). A novel

- zinc binding system, ZevAB, is critical for survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in a murine lung infection model. *Infect Immun*, 79 (8): 3366-76. doi: 10.1128/IAI.05135-11.
- Rose, M. C. & Voynow, J. A. (2006). Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev*, 86 (1): 245-78. doi: 10.1152/physrev.00010.2005.
- Rowe, A. K., Deming, M. S., Schwartz, B., Wasas, A., Rolka, D., Rolka, H., Ndoyo, J. & Klugman, K. P. (2000). Antimicrobial resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from children in the Central African Republic. *Pediatr Infect Dis J*, 19 (5): 438-44.
- Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, 5 (4): 725-38. doi: 10.1038/nprot.2010.5.
- Rubovitch, V., Gershnel, S. & Kalina, M. (2007). Lung epithelial cells modulate the inflammatory response of alveolar macrophages. *Inflammation*, 30 (6): 236-43. doi: 10.1007/s10753-007-9042-2.
- Rucker, R. B. & Dubick, M. A. (1984). Elastin metabolism and chemistry: potential roles in lung development and structure. *Environ Health Perspect*, 55: 179-91.
- Russell, R. E., Thorley, A., Culpitt, S. V., Dodd, S., Donnelly, L. E., Demattos, C., Fitzgerald, M. & Barnes, P. J. (2002). Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283 (4): L867-73. doi: 10.1152/ajplung.00020.2002.
- Saetta, M., Baraldo, S., Turato, G., Beghe, B., Casoni, G. L., Bellettato, C. M., Rea, F., Zuin, R., Fabbri, L. M. & Papi, A. (2003). Increased proportion of CD8+ T-lymphocytes in the paratracheal lymph nodes of smokers with mild COPD. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 20 (1): 28-32.
- Salvado, M. D., Di Gennaro, A., Lindbom, L., Agerberth, B. & Haeggstrom, J. Z. (2013). Cathelicidin LL-37 induces angiogenesis via PGE2-EP3 signaling in endothelial cells, *in vivo* inhibition by aspirin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33 (8): 1965-72. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301851.
- Sanders, J. D., Cope, L. D. & Hansen, E. J. (1994). Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 62 (10): 4515-25.
- Schaar, V., Uddback, I., Nordstrom, T. & Riesbeck, K. (2014). Group A streptococci are protected from amoxicillin-mediated killing by vesicles containing beta-lactamase derived from *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*, 69 (1): 117-20. doi: 10.1093/jac/dkt307.
- Schachern, P. A., Tsuprun, V., Wang, B., Apicella, M. A., Cureoglu, S., Paparella, M. M. & Juhn, S. K. (2009). Effect of lipooligosaccharide mutations of *Haemophilus influenzae* on the middle and inner ears. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 73 (12): 1757-60. doi: 10.1016/j.ijporl.2009.09.034.
- Schlor, S., Herbert, M., Rodenburg, M., Blass, J. & Reidl, J. (2000). Characterization of ferrochelatase (*hemH*) mutations in *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 68 (5): 3007-9.
- Schmidt, R., Meier, U., Markart, P., Grimminger, F., Velcovsky, H. G., Morr, H., Seeger, W. &

- Gunther, A. (2002). Altered fatty acid composition of lung surfactant phospholipids in interstitial lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283 (5): L1079-85. doi: 10.1152/ajplung.00484.2001.
- Schwartz, J. (2000). Role of polyunsaturated fatty acids in lung disease. *Am J Clin Nutr*, 71 (1 Suppl): 393S-6S. doi: 10.1093/ajcn/71.1.393s.
- Schweda, E. K., Richards, J. C., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (2007). Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: implication in virulence. *Int J Med Microbiol*, 297 (5): 297-306. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.03.007.
- Seale, T. W., Morton, D. J., Whitby, P. W., Wolf, R., Kosanke, S. D., VanWagoner, T. M. & Stull, T. L. (2006). Complex role of hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin binding proteins in *Haemophilus influenzae* virulence in the infant rat model of invasive infection. *Infect Immun*, 74 (11): 6213-25. doi: 10.1128/IAI.00744-06.
- Seemungal, T., Harper-Owen, R., Bhowmik, A., Moric, I., Sanderson, G., Message, S., Maccallum, P., Meade, T. W., Jeffries, D. J., Johnston, S. L., et al. (2001). Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 164 (9): 1618-23. doi: 10.1164/ajrccm.164.9.2105011.
- Seemungal, T. A., Donaldson, G. C., Paul, E. A., Bestall, J. C., Jeffries, D. J. & Wedzicha, J. A. (1998). Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 157 (5 Pt 1): 1418-22. doi: 10.1164/ajrccm.157.5.9709032.
- Seemungal, T. A., Wilkinson, T. M., Hurst, J. R., Perera, W. R., Sapsford, R. J. & Wedzicha, J. A. (2008). Long-term erythromycin therapy is associated with decreased chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*, 178 (11): 1139-47. doi: 10.1164/rccm.200801-145OC.
- Segal, L. N., Alekseyenko, A. V., Clemente, J. C., Kulkarni, R., Wu, B., Gao, Z., Chen, H., Berger, K. I., Goldring, R. M., Rom, W. N., et al. (2013). Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome*, 1 (1): 19. doi: 10.1186/2049-2618-1-19.
- Segatori, L., Murphy, L., Arredondo, S., Kadokura, H., Gilbert, H., Beckwith, J. & Georgiou, G. (2006). Conserved role of the linker alpha-helix of the bacterial disulfide isomerase DsbC in the avoidance of misoxidation by DsbB. *J Biol Chem*, 281 (8): 4911-9. doi: 10.1074/jbc.M505453200.
- Serisier, D. J. (2013). Risks of population antimicrobial resistance associated with chronic macrolide use for inflammatory airway diseases. *Lancet Respir Med*, 1 (3): 262-74. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70038-9.
- Sethi, S. & Murphy, T. F. (2001). Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev*, 14 (2): 336-63. doi: 10.1128/CMR.14.2.336-363.2001.
- Sethi, S., Evans, N., Grant, B. J. & Murphy, T. F. (2002). New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 347 (7): 465-71. doi: 10.1056/

NEJMoa012561.

Sethi, S. & Murphy, T. F. (2008). Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 359 (22): 2355-65. doi: 10.1056/NEJMra0800353.

Sethi, S., Wrona, C., Eschberger, K., Lobbins, P., Cai, X. & Murphy, T. F. (2008). Inflammatory profile of new bacterial strain exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 177 (5): 491-7. doi: 10.1164/rccm.200708-1234OC.

Sethi, S., Jones, P. W., Theron, M. S., Miravittles, M., Rubinstein, E., Wedzicha, J. A., Wilson, R. & group, P. S. (2010). Pulsed moxifloxacin for the prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Respir Res*, 11: 10. doi: 10.1186/1465-9921-11-10.

Sethi, S., Anzueto, A., Miravittles, M., Arvis, P., Alder, J., Haverstock, D., Trajanovic, M. & Wilson, R. (2016). Determinants of bacteriological outcomes in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Infection*, 44 (1): 65-76. doi: 10.1007/s15010-015-0833-3.

Severi, E., Randle, G., Kivlin, P., Whitfield, K., Young, R., Moxon, R., Kelly, D., Hood, D. & Thomas, G. H. (2005). Sialic acid transport in *Haemophilus influenzae* is essential for lipopolysaccharide sialylation and serum resistance and is dependent on a novel tripartite ATP-independent periplasmic transporter. *Mol Microbiol*, 58 (4): 1173-85. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04901.x.

Severi, E., Hood, D. W. & Thomas, G. H. (2007). Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology*, 153 (Pt 9): 2817-22. doi: 10.1099/mic.0.2007/009480-0.

Shapiro, S. D., Goldstein, N. M., Houghton, A. M., Kobayashi, D. K., Kelley, D. & Belaaouaj, A. (2003). Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol*, 163 (6): 2329-35. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63589-4.

Sharma, R. & Rao, D. N. (2012). Functional characterization of UvrD helicases from *Haemophilus influenzae* and *Helicobacter pylori*. *FEBS J*, 279 (12): 2134-55. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08599.x.

Sharpe, S. W., Kuehn, M. J. & Mason, K. M. (2011). Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 79 (11): 4361-9. doi: 10.1128/IAI.05332-11.

Shelton, C. L., Raffel, F. K., Beatty, W. L., Johnson, S. M. & Mason, K. M. (2011). Sap transporter mediated import and subsequent degradation of antimicrobial peptides in *Haemophilus*. *PLoS Pathog*, 7 (11): e1002360. doi: 10.1371/journal.ppat.1002360.

Shohaimi, S., Welch, A., Bingham, S., Luben, R., Day, N., Wareham, N. & Khaw, K. T. (2004). Area deprivation predicts lung function independently of education and social class. *Eur Respir J*, 24 (1): 157-61.

Siddiqui, S. H., Guasconi, A., Vestbo, J., Jones, P., Agustí, A., Paggiaro, P., Wedzicha, J. A. & Singh, D. (2015). Blood eosinophils: a biomarker of response to extrafine beclomethasone/formoterol in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 192 (4): 523-5.

doi: 10.1164/rccm.201502-0235LE.

Silva, G. E., Sherrill, D. L., Guerra, S. & Barbee, R. A. (2004). Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study. *Chest*, 126 (1): 59-65. doi: 10.1378/chest.126.1.59.

Silverberg, D. S., Mor, R., Weu, M. T., Schwartz, D., Schwartz, I. F. & Chernin, G. (2014). Anemia and iron deficiency in COPD patients: prevalence and the effects of correction of the anemia with erythropoiesis stimulating agents and intravenous iron. *BMC Pulm Med*, 14: 24. doi: 10.1186/1471-2466-14-24.

Silverman, E. K., Pierce, J. A., Province, M. A., Rao, D. C. & Campbell, E. J. (1989). Variability of pulmonary function in alpha-1-antitrypsin deficiency: clinical correlates. *Ann Intern Med*, 111 (12): 982-91.

Silverman, E. K. & Speizer, F. E. (1996). Risk factors for the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Med Clin North Am*, 80 (3): 501-22.

Singh, B., Al-Jubair, T., Morgelin, M., Thunnissen, M. M. & Riesbeck, K. (2013). The unique structure of *Haemophilus influenzae* protein E reveals multiple binding sites for host factors. *Infect Immun*, 81 (3): 801-14. doi: 10.1128/IAI.01111-12.

Sinha, S., Mell, J. C. & Redfield, R. J. (2012). Seventeen Sxy-dependent cyclic AMP receptor protein site-regulated genes are needed for natural transformation in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 194 (19): 5245-54. doi: 10.1128/JB.00671-12.

Sinha, S., Mell, J. & Redfield, R. (2013). The availability of purine nucleotides regulates natural competence by controlling translation of the competence activator Sxy. *Mol Microbiol*, 88 (6): 1106-19. doi: 10.1111/mmi.12245.

Sinha, S. K. & Detsky, A. S. (2012). Measure, promote, and reward mobility to prevent falls in older patients. *JAMA*, 308 (24): 2573-4. doi: 10.1001/jama.2012.68313.

Sitaram, N. & Nagaraj, R. (2002). Host-defense antimicrobial peptides: importance of structure for activity. *Curr Pharm Des*, 8 (9): 727-42.

Skaar, E. P. (2010). The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog*, 6 (8): e1000949. doi: 10.1371/journal.ppat.1000949.

Snider, G. L., Lucey, E. C. & Stone, P. J. (1986). Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis*, 133 (1): 149-69. doi: 10.1164/arrd.1986.133.1.149.

Soares, M. P. & Weiss, G. (2015). The Iron age of host-microbe interactions. *EMBO Rep*, 16 (11): 1482-500. doi: 10.15252/embr.201540558.

Sohn, S. H., Jang, H., Kim, Y., Jang, Y. P., Cho, S. H., Jung, H., Jung, S. & Bae, H. (2013). The effects of Gamijinhae-tang on elastase/lipopolysaccharide-induced lung inflammation in an animal model of acute lung injury. *BMC Complement Altern Med*, 13: 176. doi: 10.1186/1472-6882-13-176.

Soler Artigas, M., Wain, L. V., Repapi, E., Obeidat, M., Sayers, I., Burton, P. R., Johnson, T.,

- Zhao, J. H., Albrecht, E., Dominiczak, A. F., et al. (2011). Effect of five genetic variants associated with lung function on the risk of chronic obstructive lung disease, and their joint effects on lung function. *Am J Respir Crit Care Med*, 184 (7): 786-95. doi: 10.1164/rccm.201102-0192OC.
- Song, L. Y., Goff, M., Davidian, C., Mao, Z., London, M., Lam, K., Yung, M. & Miller, J. H. (2016). Mutational consequences of ciprofloxacin in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 60 (10): 6165-72. doi: 10.1128/AAC.01415-16.
- Sorensen, O., Arnljots, K., Cowland, J. B., Bainton, D. F. & Borregaard, N. (1997). The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*, 90 (7): 2796-803.
- Spahich, N. A., Hood, D. W., Moxon, E. R. & St Geme, J. W., 3rd. (2012). Inactivation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide biosynthesis genes interferes with outer membrane localization of the *hap* autotransporter. *J Bacteriol*, 194 (7): 1815-22. doi: 10.1128/JB.06316-11.
- Spond, J., Billah, M. M., Chapman, R. W., Egan, R. W., Hey, J. A., House, A., Kreutner, W. & Minnicozzi, M. (2004). The role of neutrophils in LPS-induced changes in pulmonary function in conscious rats. *Pulm Pharmacol Ther*, 17 (3): 133-40. doi: 10.1016/j.pupt.2004.01.003.
- Sporer, A. J., Kahl, L. J., Price-Whelan, A. & Dietrich, L. E. P. (2017). Redox-based regulation of bacterial development and behavior. *Annu Rev Biochem*, 86: 777-797. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044453.
- Spurzem, J. R. & Rennard, S. I. (2005). Pathogenesis of COPD. *Semin Respir Crit Care Med*, 26 (2): 142-53. doi: 10.1055/s-2005-869535.
- St Geme, J. W., 3rd & Falkow, S. (1990). *Haemophilus influenzae* adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect Immun*, 58 (12): 4036-44.
- St Geme, J. W., 3rd, Falkow, S. & Barenkamp, S. J. (1993). High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (7): 2875-9.
- St Geme, J. W., 3rd. (1994). The HMW1 adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae* recognizes sialylated glycoprotein receptors on cultured human epithelial cells. *Infect Immun*, 62 (9): 3881-9.
- St Geme, J. W., 3rd & Cutter, D. (2000). The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol*, 182 (21): 6005-13.
- St Geme, J. W., 3rd. (2002). Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cell Microbiol*, 4 (4): 191-200.
- Starcher, B. C. & Galione, M. J. (1976). Purification and comparison of elastins from different animal species. *Anal Biochem*, 74 (2): 441-7.
- Starner, T. D., Swords, W. E., Apicella, M. A. & McCray, P. B., Jr. (2002). Susceptibility of non-

- typeable *Haemophilus influenzae* to human beta-defensins is influenced by lipooligosaccharide acylation. *Infect Immun*, 70 (9): 5287-9.
- Starner, T. D., Zhang, N., Kim, G., Apicella, M. A. & McCray, P. B., Jr. (2006). *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 174 (2): 213-20. doi: 10.1164/rccm.200509-1459OC.
- Stauff, D. L. & Skaar, E. P. (2009). The heme sensor system of *Staphylococcus aureus*. *Contrib Microbiol*, 16: 120-35. doi: 10.1159/000219376.
- Steele, K. H., O'Connor, L. H., Burpo, N., Kohler, K. & Johnston, J. W. (2012). Characterization of a ferrous iron-responsive two-component system in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 194 (22): 6162-73. doi: 10.1128/JB.01465-12.
- Stolk, J., Rudolphus, A., Davies, P., Osinga, D., Dijkman, J. H., Agarwal, L., Keenan, K. P., Fletcher, D. & Kramps, J. A. (1992). Induction of emphysema and bronchial mucus cell hyperplasia by intratracheal instillation of lipopolysaccharide in the hamster. *J Pathol*, 167 (3): 349-56. doi: 10.1002/path.1711670314.
- Stowell, S. R., Arthur, C. M., McBride, R., Berger, O., Razi, N., Heimburg-Molinaro, J., Rodrigues, L. C., Gourdine, J. P., Noll, A. J., von Gunten, S., et al. (2014). Microbial glycan microarrays define key features of host-microbial interactions. *Nat Chem Biol*, 10 (6): 470-6. doi: 10.1038/nchembio.1525.
- Strunk, R. C., Eidlen, D. M. & Mason, R. J. (1988). Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J Clin Invest*, 81 (5): 1419-26. doi: 10.1172/JCI113472.
- Su, Y. C., Mukherjee, O., Singh, B., Hallgren, O., Westergren-Thorsson, G., Hood, D. & Riesbeck, K. (2016). *Haemophilus influenzae* P4 interacts with extracellular matrix proteins promoting adhesion and serum resistance. *J Infect Dis*, 213 (2): 314-23. doi: 10.1093/infdis/jiv374.
- Sun, S., Wang, X., Wu, X., Zhao, Y., Wang, F., Liu, X., Song, Y., Wu, Z. & Liu, M. (2011). Toll-like receptor activation by helminths or helminth products to alleviate inflammatory bowel disease. *Parasit Vectors*, 4: 186. doi: 10.1186/1756-3305-4-186.
- Swords, W. E., Buscher, B. A., Ver Steeg Ii, K., Preston, A., Nichols, W. A., Weiser, J. N., Gibson, B. W. & Apicella, M. A. (2000). Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol*, 37 (1): 13-27.
- Swords, W. E., Moore, M. L., Godzicki, L., Bukofzer, G., Mitten, M. J. & VonCannon, J. (2004). Sialylation of lipooligosaccharides promotes biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 72 (1): 106-13.
- Swords, W. E. (2012). Nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms: role in chronic airway infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 97. doi: 10.3389/fcimb.2012.00097.
- Sze, M. A., Dimitriu, P. A., Hayashi, S., Elliott, W. M., McDonough, J. E., Gosselink, J. V., Co-

- per, J., Sin, D. D., Mohn, W. W. & Hogg, J. C. (2012). The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 185 (10): 1073-80. doi: 10.1164/rccm.201111-2075OC.
- Sze, M. A., Hogg, J. C. & Sin, D. D. (2014). Bacterial microbiome of lungs in COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 9: 229-238. doi: 10.2147/Copd.S38932.
- Szelestey, B. R., Heimlich, D. R., Raffel, F. K., Justice, S. S. & Mason, K. M. (2013). *Haemophilus* responses to nutritional immunity: epigenetic and morphological contribution to biofilm architecture, invasion, persistence and disease severity. *PLoS Pathog*, 9 (10): e1003709. doi: 10.1371/journal.ppat.1003709.
- Takeyama, K., Jung, B., Shim, J. J., Burgel, P. R., Dao-Pick, T., Ueki, I. F., Protin, U., Kroschel, P. & Nadel, J. A. (2001). Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280 (1): L165-72. doi: 10.1152/ajplung.2001.280.1.L165.
- Tam, A., Bates, J. H., Churg, A., Wright, J. L., Man, S. F. & Sin, D. D. (2016). Sex-related differences in pulmonary function following 6 months of cigarette exposure: implications for sexual dimorphism in mild COPD. *PLoS One*, 11 (10): e0164835. doi: 10.1371/journal.pone.0164835.
- Tanabe, N., Hoshino, Y., Marumo, S., Kiyokawa, H., Sato, S., Kinose, D., Uno, K., Muro, S., Hirai, T., Yodoi, J., et al. (2013). Thioredoxin-1 protects against neutrophilic inflammation and emphysema progression in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *PLoS One*, 8 (11): e79016. doi: 10.1371/journal.pone.0079016.
- Tandara, L., Grubisic, T. Z., Ivan, G., Jurisic, Z., Tandara, M., Gugo, K., Mladinov, S. & Salamunic, I. (2015). Systemic inflammation up-regulates serum hepcidin in exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Biochem*, 48 (18): 1252-7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.07.010.
- Taylor, J. D. (2010). COPD and the response of the lung to tobacco smoke exposure. *Pulm Pharmacol Ther*, 23 (5): 376-83. doi: 10.1016/j.pupt.2010.04.003.
- Tchoupa, A. K., Lichtenegger, S., Reidl, J. & Hauck, C. R. (2015). Outer membrane protein P1 is the CEACAM-binding adhesin of *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol*, 98 (3): 440-55. doi: 10.1111/mmi.13134.
- Thai, P., Loukoianov, A., Wachi, S. & Wu, R. (2008). Regulation of airway mucin gene expression. *Annu Rev Physiol*, 70: 405-29. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100441.
- Thompson, A. B., Bohling, T., Payvandi, F. & Rennard, S. I. (1990). Lower respiratory tract lactoferrin and lysozyme arise primarily in the airways and are elevated in association with chronic bronchitis. *J Lab Clin Med*, 115 (2): 148-58.
- Tomb, J. F. (1992). A periplasmic protein disulfide oxidoreductase is required for transformation of *Haemophilus influenzae* Rd. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (21): 10252-6.
- Tomee, J. F., Koeter, G. H., Hiemstra, P. S. & Kauffman, H. F. (1998). Secretory leukoprotease in-

- hibitor: a native antimicrobial protein presenting a new therapeutic option? *Thorax*, 53 (2): 114-6.
- Tong, H. H., Blue, L. E., James, M. A., Chen, Y. P. & DeMaria, T. F. (2000). Evaluation of phase variation of nontypeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide during nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun*, 68 (8): 4593-7.
- Torrelles, J. B., Azad, A. K., Henning, L. N., Carlson, T. K. & Schlesinger, L. S. (2008). Role of C-type lectins in mycobacterial infections. *Curr Drug Targets*, 9 (2): 102-12.
- Torrent, M., Badia, M., Moussaoui, M., Sanchez, D., Nogues, M. V. & Boix, E. (2010). Comparison of human RNase 3 and RNase 7 bactericidal action at the Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall. *FEBS J*, 277 (7): 1713-25. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07595.x.
- Toward, T. J. & Broadley, K. J. (2000). Airway reactivity, inflammatory cell influx and nitric oxide in guinea-pig airways after lipopolysaccharide inhalation. *Br J Pharmacol*, 131 (2): 271-81. doi: 10.1038/sj.bjp.0703589.
- Tracy, E., Ye, F., Baker, B. D. & Munson, R. S., Jr. (2008). Construction of non-polar mutants in *Haemophilus influenzae* using FLP recombinase technology. *BMC Mol Biol*, 9: 101. doi: 10.1186/1471-2199-9-101.
- Tristram, S., Jacobs, M. R. & Appelbaum, P. C. (2007). Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev*, 20 (2): 368-89. doi: 10.1128/CMR.00040-06.
- Trocme, C., Deffert, C., Cachat, J., Donati, Y., Tissot, C., Papacatzis, S., Braunersreuther, V., Pache, J. C., Krause, K. H., Holmdahl, R., et al. (2015). Macrophage-specific NOX2 contributes to the development of lung emphysema through modulation of SIRT1/MMP-9 pathways. *J Pathol*, 235 (1): 65-78. doi: 10.1002/path.4423.
- Troxell, B. & Hassan, H. M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*, 3: 59. doi: 10.3389/fcimb.2013.00059.
- Tsuji, B. T., Fisher, J., Boadi-Yeboah, R., Holden, P. N., Sethi, S., Pettigrew, M. M. & Murphy, T. F. (2018). Azithromycin pharmacodynamics against persistent *Haemophilus influenzae* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Antimicrob Agents Chemother*, 62 (2). doi: 10.1128/AAC.01995-17.
- Tsuji, T., Aoshiba, K. & Nagai, A. (2006). Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 174 (8): 886-93. doi: 10.1164/rccm.200509-1374OC.
- Tudor-Williams, G., Frankland, J., Isaacs, D., Mayon-White, R. T., MacFarlane, J. A., Slack, M. P., Anderson, E., Rees, D. G. & Moxon, E. R. (1989). *Haemophilus influenzae* type b disease in the Oxford region. *Arch Dis Child*, 64 (4): 517-9.
- van Ham, S. M., van Alphen, L., Mooi, F. R. & van Putten, J. P. (1994). The fimbrial gene cluster of *Haemophilus influenzae* type b. *Mol Microbiol*, 13 (4): 673-84.
- van Noord, J. A., Aumann, J. L., Janssens, E., Smeets, J. J., Verhaert, J., Disse, B., Mueller, A. & Cornelissen, P. J. (2005). Comparison of tiotropium once daily, formoterol twice dai-

ly and both combined once daily in patients with COPD. *Eur Respir J*, 26 (2): 214-22. doi: 10.1183/09031936.05.00140404.

van Noord, J. A., Buhl, R., Laforce, C., Martin, C., Jones, F., Dolker, M. & Overend, T. (2010). QVA149 demonstrates superior bronchodilation compared with indacaterol or placebo in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 65 (12): 1086-91. doi: 10.1136/thx.2010.139113.

van Opijnen, T., Bodi, K. L. & Camilli, A. (2009). Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat Methods*, 6 (10): 767-72. doi: 10.1038/nmeth.1377.

van Opijnen, T. & Camilli, A. (2013). Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 11 (7): 435-42. doi: 10.1038/nrmicro3033.

van Schilfgaarde, M., Eijk, P., Regelink, A., van Ulsen, P., Everts, V., Dankert, J. & van Alphen, L. (1999). *Haemophilus influenzae* localized in epithelial cell layers is shielded from antibiotics and antibody-mediated bactericidal activity. *Microbial Pathogenesis*, 26 (5): 249-262. doi: DOI 10.1006/mpat.1998.0269.

van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J., Trellet, M., Schmitz, C., Kastritis, P. L., Karaca, E., Melquiond, A. S. J., van Dijk, M., de Vries, S. J. & Bonvin, A. (2016). The HADDOCK 2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol*, 428 (4): 720-725. doi: 10.1016/j.jmb.2015.09.014.

Varsano, S., Kaminsky, M., Kaiser, M. & Rashkovsky, L. (2000). Generation of complement C3 and expression of cell membrane complement inhibitory proteins by human bronchial epithelium cell line. *Thorax*, 55 (5): 364-9.

Vergauwen, B., Pauwels, F., Vaneechoutte, M. & Van Beeumen, J. J. (2003). Exogenous glutathione completes the defense against oxidative stress in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 185 (5): 1572-81.

Vergauwen, B., Elegheert, J., Dansercoer, A., Devreese, B. & Savvides, S. N. (2010). Glutathione import in *Haemophilus influenzae* Rd is primed by the periplasmic heme-binding protein HbpA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (30): 13270-5. doi: 10.1073/pnas.1005198107.

Verra, F., Escudier, E., Lebargy, F., Bernaudin, J. F., De Cremoux, H. & Bignon, J. (1995). Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 151 (3 Pt 1): 630-4. doi: 10.1164/ajrccm/151.3_Pt_1.630.

Vestbo, J., Hurd, S. S., Agustí, A. G., Jones, P. W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes, P. J., Fabri, L. M., Martínez, F. J., Nishimura, M., et al. (2013). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*, 187 (4): 347-65. doi: 10.1164/rccm.201204-0596PP.

Vidal, D., Fortunato, G., Klein, W., Cortizo, L., Vasconcelos, J., Ribeiro-Dos-Santos, R., Soares, M. & Macambira, S. (2012). Alterations in pulmonary structure by elastase administration in a model of emphysema in mice is associated with functional disturbances. *Rev Port Pneumol*, 18

- (3): 128-36. doi: 10.1016/j.rppneu.2011.12.007.
- Vijayan, V. K. (2013). Chronic obstructive pulmonary disease. *Indian J Med Res*, 137 (2): 251-69.
- Viniol, C. & Vogelmeier, C. F. (2018). Exacerbations of COPD. *Eur Respir Rev*, 27 (147). doi: 10.1183/16000617.0103-2017.
- Vlahos, R., Bozinovski, S., Gualano, R. C., Ernst, M. & Anderson, G. P. (2006). Modelling COPD in mice. *Pulm Pharmacol Ther*, 19 (1): 12-7. doi: 10.1016/j.pupt.2005.02.006.
- Vogel, A. R., Szelestey, B. R., Raffel, F. K., Sharpe, S. W., Gearinger, R. L., Justice, S. S. & Mason, K. M. (2012). SapF-mediated heme-iron utilization enhances persistence and coordinates biofilm architecture of *Haemophilus*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 42. doi: 10.3389/fcimb.2012.00042.
- Voynow, J. A. & Rubin, B. K. (2009). Mucins, mucus, and sputum. *Chest*, 135 (2): 505-512. doi: 10.1378/chest.08-0412.
- Vucic, E. A., Chari, R., Thu, K. L., Wilson, I. M., Cotton, A. M., Kennett, J. Y., Zhang, M., Loneragan, K. M., Steiling, K., Brown, C. J., et al. (2014). DNA methylation is globally disrupted and associated with expression changes in chronic obstructive pulmonary disease small airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 50 (5): 912-22. doi: 10.1165/rcmb.2013-0304OC.
- Vuong, J., Wang, X., Theodore, J. M., Whitmon, J., Gomez de Leon, P., Mayer, L. W., Carlone, G. M. & Romero-Steiner, S. (2013). Absence of high molecular weight proteins 1 and/or 2 is associated with decreased adherence among non-typeable *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *J Med Microbiol*, 62 (Pt 11): 1649-56. doi: 10.1099/jmm.0.058222-0.
- Walsh, E. E., Falsey, A. R. & Hennessey, P. A. (1999). Respiratory syncytial and other virus infections in persons with chronic cardiopulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 160 (3): 791-5. doi: 10.1164/ajrcm.160.3.9901004.
- Walters, J. A., Tang, J. N., Poole, P. & Wood-Baker, R. (2017). Pneumococcal vaccines for preventing pneumonia in chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 1: CD001390. doi: 10.1002/14651858.CD001390.pub4.
- Walters, M. J., Paul-Clark, M. J., McMaster, S. K., Ito, K., Adcock, I. M. & Mitchell, J. A. (2005). Cigarette smoke activates human monocytes by an oxidant-AP-1 signaling pathway: implications for steroid resistance. *Mol Pharmacol*, 68 (5): 1343-53. doi: 10.1124/mol.105.012591.
- Wang, L., Hames, C., Schmidl, S. R. & Stulke, J. (2010). Upregulation of thymidine kinase activity compensates for loss of thymidylate synthase activity in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 77 (6): 1502-11.
- Wang, L., Hao, K., Yang, T. & Wang, C. (2017). Role of the lung microbiome in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J (Engl)*, 130 (17): 2107-2111. doi: 10.4103/0366-6999.211452.
- Watson, M. E., Jr., Burns, J. L. & Smith, A. L. (2004). Hypermutable *Haemophilus influenzae*

- with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology*, 150 (Pt 9): 2947-58. doi: 10.1099/mic.0.27230-0.
- Wedzicha, J. A., Singh, R. & Mackay, A. J. (2014). Acute COPD exacerbations. *Clin Chest Med*, 35 (1): 157-63. doi: 10.1016/j.ccm.2013.11.001.
- Wedzicha, J. A., Calverley, P. M. A., Albert, R. K., Anzueto, A., Criner, G. J., Hurst, J. R., Miravittles, M., Papi, A., Rabe, K. F., Rigau, D., et al. (2017). Prevention of COPD exacerbations: a European Respiratory Society/American Thoracic Society guideline. *Eur Respir J*, 50 (3). doi: 10.1183/13993003.02265-2016.
- Weiser, J. N., Shchepetov, M. & Chong, S. T. (1997). Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 65 (3): 943-50.
- Weiser, J. N. & Pan, N. (1998). Adaptation of *Haemophilus influenzae* to acquired and innate humoral immunity based on phase variation of lipopolysaccharide. *Mol Microbiol*, 30 (4): 767-75.
- Weiser, J. N., Pan, N., McGowan, K. L., Musher, D., Martin, A. & Richards, J. (1998). Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J Exp Med*, 187 (4): 631-40.
- Weiser, J. N. (2000). The generation of diversity by *Haemophilus influenzae*. *Trends Microbiol*, 8 (10): 433-5.
- Whitby, P. W., Sim, K. E., Morton, D. J., Patel, J. A. & Stull, T. L. (1997). Transcription of genes encoding iron and heme acquisition proteins of *Haemophilus influenzae* during acute otitis media. *Infect Immun*, 65 (11): 4696-700.
- Whitby, P. W., Vanwagoner, T. M., Seale, T. W., Morton, D. J. & Stull, T. L. (2006). Transcriptional profile of *Haemophilus influenzae*: effects of iron and heme. *J Bacteriol*, 188 (15): 5640-5. doi: 10.1128/JB.00417-06.
- Whitby, P. W., Seale, T. W., VanWagoner, T. M., Morton, D. J. & Stull, T. L. (2009). The iron/heme regulated genes of *Haemophilus influenzae*: comparative transcriptional profiling as a tool to define the species core modulon. *BMC Genomics*, 10: 6. doi: 10.1186/1471-2164-10-6.
- Whitby, P. W., Morton, D. J., Vanwagoner, T. M., Seale, T. W., Cole, B. K., Mussa, H. J., McGhee, P. A., Bauer, C. Y., Springer, J. M. & Stull, T. L. (2012). *Haemophilus influenzae* OxyR: characterization of its regulation, regulon and role in fitness. *PLoS One*, 7 (11): e50588. doi: 10.1371/journal.pone.0050588.
- Whitby, P. W., VanWagoner, T. M., Seale, T. W., Morton, D. J. & Stull, T. L. (2013). Comparison of transcription of the *Haemophilus influenzae* iron/heme modulon genes *in vitro* and *in vivo* in the chinchilla middle ear. *BMC Genomics* (14): 925. doi: 10.1186/1471-2164-14-925.
- White, D. C. & Granick, S. (1963). Hemin Biosynthesis in *Haemophilus*. *J Bacteriol*, 85: 842-50.

- Wiese, K. M., Coates, B. M. & Ridge, K. M. (2017). The role of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors in pulmonary infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 57 (2): 151-161. doi: 10.1165/rcmb.2016-0375TR.
- Wiktorowska-Owczarek, A., Berezinska, M. & Nowak, J. Z. (2015). PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med*, 24 (6): 931-41. doi: 10.17219/acem/31243.
- Wilk, J. B., Shrine, N. R., Loehr, L. R., Zhao, J. H., Manichaikul, A., Lopez, L. M., Smith, A. V., Heckbert, S. R., Smolonska, J., Tang, W., et al. (2012). Genome-wide association studies identify CHRNA5/3 and HTR4 in the development of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*, 186 (7): 622-32. doi: 10.1164/rccm.201202-0366OC.
- Wilkinson, T. M. A., Aris, E., Bourne, S., Clarke, S. C., Peeters, M., Pascal, T. G., Schoonbroodt, S., Tuck, A. C., Kim, V., Ostridge, K., et al. (2017). A prospective, observational cohort study of the seasonal dynamics of airway pathogens in the aetiology of exacerbations in COPD. *Thorax*, 72 (10): 919-927. doi: 10.1136/thoraxjnl-2016-209023.
- Williams, B. J., Morlin, G., Valentine, N. & Smith, A. L. (2001). Serum resistance in an invasive, nontypeable *Haemophilus influenzae* strain. *Infect Immun*, 69 (2): 695-705. doi: 10.1128/IAI.69.2.695-705.2001.
- Willner, D., Haynes, M. R., Furlan, M., Schmieder, R., Lim, Y. W., Rainey, P. B., Rohwer, F. & Conrad, D. (2012). Spatial distribution of microbial communities in the cystic fibrosis lung. *ISME J*, 6 (2): 471-4. doi: 10.1038/ismej.2011.104.
- Winter, L. E. & Barenkamp, S. J. (2009). Antibodies specific for the Hia adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate opsonophagocytic activity. *Clin Vaccine Immunol*, 16 (7): 1040-6. doi: 10.1128/CVI.00090-09.
- Wong, J., Magun, B. E. & Wood, L. J. (2016). Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 11: 1391-401. doi: 10.2147/COPD.S106009.
- Wong, J. C., Patel, R., Kendall, D., Whitby, P. W., Smith, A., Holland, J. & Williams, P. (1995). Affinity, conservation, and surface exposure of hemopexin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 63 (6): 2327-33.
- Wong, S. M., St Michael, F., Cox, A., Ram, S. & Akerley, B. J. (2011). ArcA-regulated glycosyltransferase *lic2B* promotes complement evasion and pathogenesis of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 79 (5): 1971-83. doi: 10.1128/IAI.01269-10.
- Wong, S. M. & Akerley, B. J. (2012). Genome-scale approaches to identify genes essential for *Haemophilus influenzae* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2:23. doi: 10.3389/fcimb.2012.00023.
- Wong, S. M., Bernui, M., Shen, H. & Akerley, B. J. (2013). Genome-wide fitness profiling reveals adaptations required by *Haemophilus* in coinfection with influenza A virus in the murine lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (38): 15413-8. doi: 10.1073/pnas.1311217110.
- Wood, L. G., Scott, H. A., Garg, M. L. & Gibson, P. G. (2009). Innate immune mechanisms linking non-esterified fatty acids and respiratory disease. *Prog Lipid Res*, 48 (1): 27-43. doi:

10.1016/j.plipres.2008.10.001.

Wortham, B. W., Eppert, B. L., Motz, G. T., Flury, J. L., Orozco-Levi, M., Hoebe, K., Panos, R. J., Maxfield, M., Glasser, S. W., Senft, A. P., et al. (2012). NKG2D mediates NK cell hyperresponsiveness and influenza-induced pathologies in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*, 188 (9): 4468-75. doi: 10.4049/jimmunol.1102643.

Wright, J. R. (2005). Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*, 5 (1): 58-68. doi: 10.1038/nri1528.

Wright, J. L. & Churg, A. (2008). Animal models of COPD: Barriers, successes, and challenges. *Pulm Pharmacol Ther*, 21 (5): 696-8. doi: 10.1016/j.pupt.2008.01.007.

Wright, J. L., Cosio, M. & Churg, A. (2008). Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295 (1): L1-15. doi: 10.1152/ajplung.90200.2008.

Wright, J. L., Zhou, S. & Churg, A. (2012). Pulmonary hypertension and vascular oxidative damage in cigarette smoke exposed eNOS (-/-) mice and human smokers. *Inhal Toxicol*, 24 (11): 732-40. doi: 10.3109/08958378.2012.715698.

Wu, S., Baum, M. M., Kerwin, J., Guerrero, D., Webster, S., Schaudinn, C., VanderVelde, D. & Webster, P. (2014). Biofilm-specific extracellular matrix proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Pathog Dis*, 72 (3): 143-60. doi: 10.1111/2049-632X.12195.

Wu, X., Chen, D., Gu, X., Su, X., Song, Y. & Shi, Y. (2014). Prevalence and risk of viral infection in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 41 (7): 4743-51. doi: 10.1007/s11033-014-3345-9.

Xiao, W., Hsu, Y. P., Ishizaka, A., Kirikae, T. & Moss, R. B. (2005). Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation. *Chest*, 128 (4): 2316-26. doi: 10.1378/chest.128.4.2316.

Xu, F., Liu, X. C., Li, L., Ma, C. N. & Zhang, Y. J. (2017). Effects of TRPC1 on epithelial mesenchymal transition in human airway in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicine (Baltimore)*, 96 (43): e8166. doi: 10.1097/MD.00000000000008166.

Yang, J., Roy, A. & Zhang, Y. (2013a). BioLiP: a semi-manually curated database for biologically relevant ligand-protein interactions. *Nucleic Acids Res*, 41 (Database issue): D1096-103. doi: 10.1093/nar/gks966.

Yang, J., Roy, A. & Zhang, Y. (2013b). Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics*, 29 (20): 2588-95. doi: 10.1093/bioinformatics/btt447.

Yang, J., Moon, H. G., Chettimada, S. & Jin, Y. (2014). Cross-talk between apoptosis and autophagy in lung epithelial cell death. *J Biochem Pharmacol Res*, 2 (2): 99-109.

Yang, S., Nugent, M. A. & Panchenko, M. P. (2008). EGF antagonizes TGF-beta-induced tropoelastin expression in lung fibroblasts via stabilization of Smad corepressor TGIF. *Am J Physiol*

Lung Cell Mol Physiol, 295 (1): L143-51. doi: 10.1152/ajplung.00289.2007.

Yao, H., Chung, S., Hwang, J. W., Rajendrasozhan, S., Sundar, I. K., Dean, D. A., McBurney, M. W., Guarente, L., Gu, W., Ronty, M., et al. (2012). SIRT1 protects against emphysema via FOXO3-mediated reduction of premature senescence in mice. *J Clin Invest*, 122 (6): 2032-45. doi: 10.1172/JCI160132.

Yogiara, Kim, D., Hwang, J. K. & Pan, J. G. (2015). *Escherichia coli* ASKA Clone Library Harboring tRNA-Specific Adenosine Deaminase (*tadA*) Reveals Resistance towards *Xanthorrhizol*. *Molecules*, 20 (9): 16290-305. doi: 10.3390/molecules200916290.

Yun, Y., Srinivas, G., Kuenzel, S., Linnenbrink, M., Alnahas, S., Bruce, K. D., Steinhoff, U., Baines, J. F. & Schaible, U. E. (2014). Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. *PLoS One*, 9 (12): e113466. doi: 10.1371/journal.pone.0113466.

Zambolin, S., Clantin, B., Chami, M., Hoos, S., Haouz, A., Villeret, V. & Delepelaire, P. (2016). Structural basis for haem piracy from host haemopexin by *Haemophilus influenzae*. *Nat Commun*, 7: 11590. doi: 10.1038/ncomms11590.

Zaleski, P. & Piekawicz, A. (2004). Characterization of a *dam* mutant of *Haemophilus influenzae* Rd. *Microbiology*, 150 (Pt 11): 3773-81. doi: 10.1099/mic.0.27225-0.

Zaleski, P., Wojciechowski, M. & Piekawicz, A. (2005). The role of Dam methylation in phase variation of *Haemophilus influenzae* genes involved in defence against phage infection. *Microbiology*, 151 (Pt 10): 3361-9. doi: 10.1099/mic.0.28184-0.

Zhang, J., Dyer, K. D. & Rosenberg, H. F. (2003). Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Res*, 31 (2): 602-7.

Zhang, P., Summer, W. R., Bagby, G. J. & Nelson, S. (2000). Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev*, 173: 39-51.

Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9: 40. doi: 10.1186/1471-2105-9-40.

Zhang, Z., Cheng, X., Yue, L., Cui, W., Zhou, W., Gao, J. & Yao, H. (2018). Molecular pathogenesis in chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic potential by targeting AMP-activated protein kinase. *J Cell Physiol*, 233 (3): 1999-2006. doi: 10.1002/jcp.25844.

Zheng, J. P., Kang, J., Huang, S. G., Chen, P., Yao, W. Z., Yang, L., Bai, C. X., Wang, C. Z., Wang, C., Chen, B. Y., et al. (2008). Effect of carbocysteine on acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (PEACE Study): a randomised placebo-controlled study. *Lancet*, 371 (9629): 2013-8. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60869-7.

Zhou, Y., Kang, M. J., Jha, B. K., Silverman, R. H., Lee, C. G. & Elias, J. A. (2013). Role of ribonuclease L in viral pathogen-associated molecular pattern/influenza virus and cigarette smoke-induced inflammation and remodeling. *J Immunol*, 191 (5): 2637-46. doi: 10.4049/jimmunol.1300082.

Zhou, S., Wright, J. L., Liu, J., Sin, D. D. & Churg, A. (2013). Aging does not enhance experimental cigarette smoke-induced COPD in the mouse. *PLoS One*, 8 (8): e71410. doi: 10.1371/journal.pone.0071410.

Zwaans, W. A., Mallia, P., van Winden, M. E. & Rohde, G. G. (2014). The relevance of respiratory viral infections in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease-a systematic review. *J Clin Virol*, 61 (2): 181-8. doi: 10.1016/j.jcv.2014.06.025.

Anexo I

Tablas Suplementarias

Tabla A1. Genes de HiNT identificados en los escrutinios *in vitro* e *in vivo*, y fenotipos asociados. Adaptada de (Wong & Akerley, 2012).

Gen	Función ^a	Fenotipos descritos	Referencia ^b
Membrana externa (posible localización)			
<i>hap</i>	Adhesina	Formación biopelículas, interacción con matriz extracelular, epitelio respiratorio y macrófagos, auto-agregación, infección pulmonar modelo murino.	(Baddal et al., 2015; Euba et al., 2015c; Meng et al., 2011)
<i>hel</i>	Lipoproteína E (P4)	Captación de hemina, utilización de NAD, modelo bacteriemia en rata e infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Kemmer et al., 2001; Morton et al., 2007b; Reidl & Mekalanos, 1996)
<i>hia</i>	Adhesina	Resistencia a opsonofagocitosis, interacción epitelio respiratorio, modelo bacteriemia en rata.	(Baddal et al., 2015; Herbert et al., 2002; St Geme & Cutter, 2000; St Geme, 2002; Winter & Barenkamp, 2009)
<i>hmv/A</i>	Adhesina/Invasina	Fenotipo hiperinvasor, interacción epitelio respiratorio y macrófagos, crecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> .	(Mell et al., 2016; Noel et al., 1994; Qu et al., 2010; St Geme et al., 1993; Vuong et al., 2013)
<i>hmv/B</i>	Adhesina/Invasina	Interacción epitelio respiratorio y macrófagos, crecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> .	(Mell et al., 2016; Qu et al., 2010)
<i>vacJ</i>	Lipoproteína	Estabilidad membrana externa; resistencia a suero. AMPs y antimicrobianos hidrofóbicos, interacción epitelio respiratorio, infección pulmonar modelo murino.	(Fernandez-Calvet et al., 2018; Gawronski et al., 2009; Nakamura et al., 2011)
<i>lolA</i>	Lipoproteína	Infección oído medio en modelo de chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>lppB</i>	Lipoproteína B	Formación de biopelículas, infección oído medio en modelo de chinchilla.	(Marri et al., 2017; Mason et al., 2003)
<i>lppC</i>	Lipoproteína C	Formación de biopelículas.	(Marri et al., 2017)
<i>nlpD</i>	Lipoproteína	División celular, estabilidad membrana externa, infección pulmonar en modelo murino.	(Ercoli et al., 2015; Gawronski et al., 2009)
<i>oapA</i>	<i>Opacity Associated Protein</i>	Interacción epitelio de conjuntivo y respiratorio, colonización nasofaríngea en rata, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Martí-Literas et al., 2011; Prasadarao et al., 1999; Weiser et al., 1997)
<i>olpA1</i>	Adhesina	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>ompE</i>	OMP-E	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>ompP5</i>	OMP-P5	Formación biopelículas, interacción e infección de epitelio respiratorio, infección pulmonar modelo murino.	(Wong et al., 2013)
<i>ompP26</i>	OMP-P26	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>yrbB</i>	Proteína de unión NTP	Resistencia a suero.	(Nakamura et al., 2011)
<i>yrbC</i>	Transportador ABC	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Wong et al., 2013)
<i>yrbD</i>	Transportador ABC	Resistencia a suero, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Nakamura et al., 2011)
<i>yrbE</i>	Transportador ABC, permeasa	Resistencia a suero, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Nakamura et al., 2011)
<i>yrbF</i>	Transportador ABC, ATPasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
Biosíntesis de LOS			
<i>galE</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa	Resistencia a suero, evasión muerte mediada por neutrófilos, infección pulmonar modelo murino	(Gawronski et al., 2009; Langereis & Weiser, 2014; Masoud et al., 2008; Nakamura et al., 2011; Wong et al., 2013)
<i>galU</i>	Glucosa-fosfato-uridil-transferasa	Localización adhesinas en membrana externa (Hap), resistencia a suero, evasión muerte mediada por neutrófilos, infección pulmonar modelo murino, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Langereis & Weiser, 2014; Nakamura et al., 2011; Wong et al., 2013)
<i>gnhA</i>	Fosfoheptosa isomerasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>gnhB</i>	D,D-heptosa-1,7-bifosfato fosfatasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>lgtF</i>	β-1,4-glucosil-transferasa	Resistencia AMPs y suero, interacción epitelio respiratorio, infección pulmonar modelo murino	(Gawronski et al., 2009; Hood et al., 2004; Morey et al., 2013; Nakamura et al., 2011)

<i>gmhA</i>	Fosfoheptosa isomerasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>gmhB</i>	D,D-heptosa-1,7-bisfosfato fosfatasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>igrF</i>	β -1,4-glucosil-transferasa	Resistencia AMPs y suero, interacción epitelio respiratorio, infección pulmonar modelo murino	(Gawronski et al., 2009; Hood et al., 2004; Morey et al., 2013; Nakamura et al., 2011)
<i>lex2B</i>	β -1,4-glucosil-transferasa	Resistencia a suero	(Deadman et al., 2009; Engskog et al., 2009; Morey et al., 2013; Nakamura et al., 2011)
<i>igrC</i>	Glicosiltransferasa	Localización adhesinas en membrana externa (Hap), evasión complemento, resistencia a suero, evasión muerte mediada por neutrófilos, infección modelo otitis media en chinchilla.	(Clark et al., 2013; Erwin et al., 2006; Ho et al., 2007; Langerreis et al., 2014; Nakamura et al., 2011; Richards et al., 2001; Tong et al., 2000)
<i>litA</i>	Colina quinasa	Resistencia a suero, modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002; Humphries & High, 2002; Weiser et al., 1997)
<i>litD</i>	Galactosiltransferasa	Evasión complemento, crecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> , infección modelo de otitis media en chinchilla	(Hong et al., 2007; Lysenko et al., 2000b; Qu et al., 2010)
<i>litZ4</i>	UDP-Gal-hipopoligosacárido galactosiltransferasa	Localización adhesinas en membrana externa (Hap), resistencia AMPs, evasión complemento, evasión de muerte mediada por neutrófilos, auto-agregación, formación biopelículas, infección otitis media modelo chinchilla, modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002; Humphries & High, 2002; Langerreis et al., 2014; Weiser et al., 1997)
<i>lpsA</i>	Glicosiltransferasa	Resistencia a suero y AMPs, interacción con epitelio respiratorio, infección pulmonar modelo murino.	(Deadman et al., 2006; Gawronski et al., 2009; Hood et al., 2004; Lichenegger et al., 2017; Mansson et al., 2003; Morey et al., 2013; Nakamura et al., 2011)
<i>opsX</i>	Heptosiltransferasa I	Resistencia AMPs, interacción epitelio respiratorio, infección modelo pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009; Gronow et al., 2005; Morey et al., 2013)
<i>orfH</i>	Heptosiltransferasa	Resistencia a suero, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Nakamura et al., 2011)
<i>pgmB</i>	Fostomanomutasa	Localización adhesinas en membrana externa (Hap), resistencia a suero, interacción epitelio respiratorio, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Nakamura et al., 2011; Spahlich et al., 2012; Swords, 2012)
<i>rfaD</i>	ADP-L-glicero-D-manoheptosa-6-epimerasa	Evasión de muerte mediada por neutrófilos, infección modelo otitis media en chinchilla y pulmonar en modelo murino.	(DeMaria et al., 1997; Gawronski et al., 2009; Langerreis & Weiser, 2014; Nichols et al., 1997; Schachern et al., 2009)
<i>rfaE</i>	Heptosa 7-fosfatato quinasa/heptosa 1-fosfato adeniltransferasa	Evasión de muerte mediada por neutrófilos.	(Langerreis & Weiser, 2014)
<i>rfaF</i>	ADP-heptosa-LPS heptosiltransferasa II	Localización adhesinas en membrana externa (Hap), evasión de muerte mediada por neutrófilos, infección pulmonar modelo murino.	(DeMaria et al., 1997; Gawronski et al., 2009; Langerreis & Weiser, 2014; Nichols et al., 1997; Spahlich et al., 2012)
Peptidoglicano			
<i>ampG</i>	Permeasa A	Formación de biopelículas.	(Martí et al., 2017)
<i>amiB</i>	N-Acetiluramamilo-L-alanina amidasa	Formación biopelículas, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Martí et al., 2017)
<i>mltC</i>	Transglicosilasa C, unión a mureína lítica	Formación biopelículas, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Martí et al., 2017)
<i>mreC</i>	Proteína <i>rod-shape determining</i>	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>mreD</i>	Proteína <i>rod-shape determining</i>	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>rodA</i>	Proteína <i>rod-shape determining</i>	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
Adquisición de nutrientes			
Fe/Hemina			
<i>afuB</i>	Transportador ABC Fe ²⁺ , permeasa	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
<i>fhua</i>	Proteína de captación de hidroximato férrico	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)

<i>fnuB</i>	Transportador ABC hidroximato férrico, permeasa	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>fnuC</i>	Transportador ABC hidroximato férrico, ATPasa	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>fnuD</i>	Transportador ABC hidroximato férrico, proteína periplásmica	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>fnrS</i>	Sensor de la proteína OseC	Sensor Fe, infección pulmonar modelo murino	(Steele et al., 2012; Wong et al., 2013)
<i>hitA</i>	Transportador ABC Fe ³⁺ , proteína periplásmica	Captación de Fe, crecimiento esputo humano <i>in vitro</i> , infección epitelio respiratorio	(Adhikari et al., 1995; Baddal et al., 2015; Kirby et al., 1994)
<i>hitB</i>	Transportador ABC Fe ³⁺ , permeasa	Captación de Fe, infección epitelio respiratorio	(Adhikari et al., 1995; Baddal et al., 2015; Kirby et al., 1994)
<i>hitC</i>	Transportador ABC Fe ³⁺ , ATPasa	Captación de Fe, infección epitelio respiratorio	(Cope et al., 1995; Morton et al., 2007a; Qu et al., 2010)
<i>hxaB</i>	Proteína B de unión Fe-hemopexina	Captación de Fe-hemopexina, crecimiento esputo humano <i>in vitro</i> , modelo bacteriemia en rata	(Mason et al., 2003; Mason et al., 2005; Mason et al., 2006; Raffel et al., 2013; Shelton et al., 2011)
<i>sapA</i>	Transportador ABC de AMPs, proteína periplásmica	Captación de hemina, resistencia AMPs, infección células epiteliales, infección modelo otitis media en chinchilla.	(Cawronski et al., 2009; Vogel et al., 2012)
<i>sapF</i>	Transportador ABC de AMPs, ATPasa	Captación de hemina, formación de biopelículas, infección modelo otitis media en chinchilla, colonización nasofaríngea e infección pulmonar modelo murino.	(Qu et al., 2010)
<i>yfeA</i>	Transportador ABC de Fe quelado, proteína periplásmica	Crecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> .	(Qu et al., 2010)
<i>yfeB</i>	Transportador ABC de Fe quelado, ATPasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Cawronski et al., 2009)
Poliaminas			
<i>potA</i>	Transportador ABC de putrescina/espermidina, ATPasa	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>potB</i>	Transportador ABC de putrescina/espermidina, proteína de membrana B	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>potC</i>	Transportador ABC de putrescina/espermidina, proteína de membrana C	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>potD</i>	Transportador ABC de putrescina/espermidina, proteína de unión a sustrato	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
Zinc			
<i>zvaA</i>	Transportador ABC Zn, proteína periplásmica	Transporte de Zn, infección pulmonar modelo murino.	(Cawronski et al., 2009; Rosadini et al., 2011)
<i>zvaB</i>	Transportador ABC Zn, permeasa	Transporte de Zn, infección pulmonar modelo murino.	(Cawronski et al., 2009; Rosadini et al., 2011)
<i>zuaA</i>	Transportador de Zn, proteína periplásmica	Infección pulmonar modelo murino.	(Cawronski et al., 2009; Qu et al., 2010)
<i>zuaB</i>	Transportador de Zn, permeasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Cawronski et al., 2009)
<i>zuaC</i>	Transportador de Zn, ATPasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Cawronski et al., 2009)
Otros			
<i>dppB</i>	Transportador ABC dipéptidos, permeasa B	Transporte periplásmico hemina, infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015; Morton et al., 2009b)

<i>dppC</i>	Transportador ABC dipéptidos, permeasa C	Transporte periplásmico hemina, infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015; Morton et al., 2009b)
<i>dppD</i>	Transportador ABC dipéptidos, ATPasa D	Transporte periplásmico hemina, infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015; Morton et al., 2009b)
<i>dppF</i>	Transportador ABC dipéptidos, ATPasa F	Transporte periplásmico hemina, infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015; Morton et al., 2009b)
<i>ermA</i>	Modelo de resistencia multidroga	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
<i>hslIU</i>	Proteasa	Crecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> .	(Qu et al., 2010)
<i>lctP</i>	L-lactato permeasa	Infección epitelio respiratorio, colonización nasofaríngea e infección pulmonar modelo murino, modelo bacteriemia en rata	(Baddal et al., 2015; Herbert et al., 2002; Lichtenegger et al., 2014)
<i>oppB</i>	Oligopéptido permeasa	Crecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> .	(Qu et al., 2010)
<i>phoB</i>	Regulación de fosfato, proteína de regulación de transcripción	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>psfA</i>	Transportador ABC fosfato, permeasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>psfB</i>	Transportador ABC fosfato, ATPasa	Crecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> , infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Qu et al., 2010)
<i>psfS</i>	Transportador ABC fosfato, proteína de unión	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>ribsC</i>	Transportador ABC ribosa, permeasa	Infección oído medio en modelo chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>tolQ</i>	Proteína transportadora de colicina	Crecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> .	(Qu et al., 2010)
<i>yebM</i>	Transportador ABC, A, TPasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
Metabolismo			
Nucleótidos			
<i>apaH</i>	Diadenosin-tetrafosfata	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>atpD</i>	FOF1 ATP sintetasa, subunidad β	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>atpG</i>	FOF1 ATP sintetasa, subunidad γ	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>deoD</i>	Purina-nucleósido fosforilasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>guaB</i>	Inositol-5-monofosfato deshidrogenasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>nadN</i>	NAD nucleotidasa	Utilización de NAD, modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009; Kemmer et al., 2001)
<i>purA</i>	Adenilo-succinato sintetasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>purB</i>	Adenilo-succinato liasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>purD</i>	Fosforribosilamino-glicina ligasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>purE</i>	Fosforribosil-amino-imidazol carboxilasa, subunidad catalítica	Modelo infección pulmonar murino e oído medio en chinchilla.	(Gawronski et al., 2009; Mason et al., 2003)
<i>purF</i>	Amidofosforribosil-transferasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>purH</i>	Fosforribosilaminoimidazoilcarbocboxa mida, proteína bifuncional	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>purL</i>	Fosforribosilformilglicinamida sintasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>purM</i>	Fosforribosilaminoimidazol sintetasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>pyrG</i>	CTP-sintetasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
Aminoácidos			
<i>aspA</i>	Aspartato amonio-liasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)

<i>aspC</i>	Aminoácido aromático aminotransferasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>argF</i>	Ornitina carbamilotransferasa	Infección oído medio en chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>arl1</i>	Transportador ABC arginina, proteína periplásmica	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>arlM</i>	Transportador ABC arginina, permeasa	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>arlP</i>	Transportador ABC arginina, ATPasa	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>arlQ</i>	Transportador ABC arginina, permeasa	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>argR</i>	Represor de arginina	Infección oído medio en chinchilla y pulmonar en modelo murino	(Mason et al., 2003; Wong et al., 2013)
<i>aspA</i>	Asparagina sintetasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>γacC</i>	Transportador ABC cistina/glutión, proteína C	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>γysK</i>	Cisteína sintetasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>γyadD</i>	Transportador ABC cistina/glutión, proteína D	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>hisA</i>	Isomerasa imidazol-4-carboxamida 1-(5-fosforribosil)-5-(5-fosforribosil-amino)-metildeneamino	Síntesis de histidina, infección pulmonar modelo murino.	(Juliao et al., 2007; Wong et al., 2013)
<i>hisB</i>	Proteína de biosíntesis de histidina	Síntesis de histidina, infección oído medio modelo chinchilla.	(Juliao et al., 2007; Mason et al., 2003)
<i>hisD</i>	Histidímol dehidrogenasa	Síntesis de histidina, infección pulmonar modelo murino.	(Juliao et al., 2007; Wong et al., 2013)
<i>hisF</i>	Imidazol-glicerol-fosfato sintetasa, subunidad F	Síntesis de histidina, infección pulmonar modelo murino.	(Juliao et al., 2007; Wong et al., 2013)
<i>hisG</i>	ATP fosforribosiltransferasa	Síntesis de histidina, infección pulmonar modelo murino.	(Juliao et al., 2007; Wong et al., 2013)
<i>ihvE</i>	Aminoácido aminotransferasa, cadena ramificada	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>meiB</i>	Cistionina sintetasa γ	Modelo bacteriemia en rata e infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Herbert et al., 2002)
<i>meiC</i>	Cistionina liasa β	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>meiE</i>	5-Metil-tetrahidroil-triglutamato-homocisteína metil-transferasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>meiX</i>	Homoserina O-acetiltransferasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>meiQ</i>	Transportador periplásmico D-metionina	Creecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> .	(Qu et al., 2010)
<i>ntr</i>	Proteína específica de transporte de triptófano	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>pheA</i>	Corimato mutasa/Prefenato dehidratasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>serA</i>	D-3-fotógluceroato dehidrogenasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>serB</i>	Fosfoserina fosfatasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>thiB</i>	Transportador ABC tiamina, proteína periplásmica	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>thiP</i>	Transportador ABC tiamina, proteína de membrana	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>thiQ</i>	Transportador ABC tiamina, ATPasa	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>trpA</i>	Triptófano sintetasa, subunidad α	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)

<i>trpB</i>	Triptófano sintasa, subunidad β	Modelo infección pulmonar murino.	(Cawronski et al., 2009)
<i>trpC</i>	Antranilato Fosforibosil-isomerasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Cawronski et al., 2009)
<i>trpD</i>	Antranilato Fosforibosil-transferasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Cawronski et al., 2009)
<i>trpG</i>	Antranilato Sintasa, Componente II	Modelo infección pulmonar murino.	(Cawronski et al., 2009)
<i>trpE</i>	Antranilato Sintasa, Componente I	Modelo infección pulmonar murino.	(Cawronski et al., 2009)
<i>trpA</i>	Prefenato dehidrogenasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Cawronski et al., 2009)
Transporte de electrones			
<i>accA</i>	Acetil-CoA carboxilasa carboxil-transferasa subunidad α	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
<i>fad-2</i>	Ferredoxina	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
<i>hprA</i>	Glicerato dehidrogenasa	Formación de biopelículas.	(Martí et al., 2017)
<i>maeB</i>	Enzima mólica dependiente de NADP	Formación de biopelículas.	(Martí et al., 2017)
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	Infección pulmonar en modelo murino.	(Wong et al., 2013)
<i>mgsA</i>	Metilglioxal sintetasa	Infección pulmonar en modelo murino.	(Cawronski et al., 2009; Wong et al., 2013)
<i>nqrC</i>	NADH-quinona reductasa traslocadora de Na, subunidad C	Infección pulmonar en modelo murino.	(Wong et al., 2013)
<i>nudC</i>	NADH piruvatoquinasa	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
H10936	Biogénesis del citocromo tipo C	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
Urea			
<i>ureA</i>	Ureasa, subunidad α	Degradación de urea, infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015; Murphy & Brauer, 2011)
<i>ureB</i>	Ureasa, subunidad β	Degradación de urea, infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015; Murphy & Brauer, 2011)
<i>ureC</i>	Ureasa, subunidad γ	Degradación de urea, infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015; Murphy & Brauer, 2011)
<i>ureE</i>	Ureasa, proteína accesoria E	Degradación de urea, infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015; Murphy & Brauer, 2011)
<i>ureF</i>	Ureasa, proteína accesoria F	Degradación de urea, infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015; Murphy & Brauer, 2011)
<i>ureG</i>	Ureasa, proteína accesoria G	Degradación de urea, infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015; Murphy & Brauer, 2011)
<i>ureH</i>	Ureasa, proteína accesoria H	Degradación de urea, infección epitelio respiratorio, infección modelo de otitis media en chinchilla y pulmonar en modelo murino.	(Baddal et al., 2015; Cawronski et al., 2009; Mason et al., 2003; Murphy & Brauer, 2011)
Otros			
<i>ginB</i>	Proteína reguladora P-II de nitrógeno	Infección pulmonar en modelo murino.	(Cawronski et al., 2009)
<i>gmbB</i>	D, D-heptosa 1,7-bisfosfato fosfatasa	Infección pulmonar en modelo murino.	(Cawronski et al., 2009)
<i>moeC</i>	Biosíntesis molibdeno, cofactor	Formación de biopelículas.	(Martí et al., 2017)
<i>pdsS</i>	Piridoxina, proteína de biosíntesis	Crecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> , infección pulmonar en modelo murino.	(Cawronski et al., 2009; Qu et al., 2010)
<i>ribB</i>	3,4-dihidroxi-2-butanona-4 fosfato sintetasa	Crecimiento en esputo humano <i>in vitro</i> , infección oído medio en chinchilla.	(Mason et al., 2003; Qu et al., 2010)
<i>rpiA</i>	Aromatizante ca-aminácido-amino transferasa	Infección pulmonar en modelo murino.	(Cawronski et al., 2009)
<i>azsA</i>	Manonato deshidrogenasa	Infección pulmonar en modelo murino.	(Cawronski et al., 2009)
<i>yhbB</i>	Fosfomanomutasa	Infección pulmonar en modelo murino.	(Cawronski et al., 2009)
H11170	Paraminobezoato sintetasa, síntesis de folato	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
Procesamiento ADN/Recombinación/Reparación/Transcripción			
<i>alaS</i>	Alamyl-ARNi sintetasa	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
<i>alaT</i>	Aminotransferasa Ala I	Infección pulmonar modelo murino.	(Cawronski et al., 2009)

<i>dam</i>	ADN adenin-metilasa	Metilación de ADN, resistencia antibióticos, detergentes, peróxido de hidrógeno, interacción células epiteliales endoteliales y bronquiales, modelo bacteriemia en rata e infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Watson et al., 2004; Zaleski & Pickarowicz, 2004; Zaleski et al., 2005)
<i>dnaQ</i>	ADN polimerasa III, subunidad ε	Formación de biopelículas.	(Marti et al., 2017)
<i>fis</i>	Proteína de unión a ADN	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>ftsE</i>	Proteína de división celular.	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
	ATPasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>ftsN</i>	Proteína de división celular	Infección pulmonar modelo murino.	(Marti et al., 2017)
<i>ftsX</i>	Proteína de división celular	Formación de biopelículas.	(Gawronski et al., 2009)
<i>gcvA</i>	Activador de transcripción, putativo	Formación de biopelículas.	(Marti et al., 2017)
<i>genX</i>	Lisil-ARNi sintetasa	Modelo infección pulmonar murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>hoiD</i>	ADN polimerasa III, subunidad ψ	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Wong et al., 2013)
<i>ihfA</i>	Factor de integración al hospedador, subunidad α	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>ihfβ</i>	Factor de integración al hospedador, subunidad β	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>ispZ</i>	Proteína de septación intracelular	Infección oído medio modelo chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>lysU</i>	Lisil ARNi sintetasa	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>mutK</i>	Remodelación de estructura de nucleótidos, proteína homóloga	Infección oído medio modelo chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>parE</i>	ADN topoisomerasa IV, subunidad B	Resistencia a ciprofloxacino, modelo bacteriemia en rata.	(Faursted et al., 2016; Herbert et al., 2002)
<i>pheS</i>	Fenilalanina ARNi ligasa, subunidad α	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>pheT</i>	Fenilalanina ARNi ligasa, subunidad β	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>radC</i>	Proteína de reparación de ADN	Infección oído medio modelo chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>recC</i>	Exodeoxirribonucleasa V, cadena γ	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>recR</i>	Proteína recombinante	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>rep</i>	ADN helicasa dependiente de ATP	-	(Marti et al., 2017)
<i>mfd</i>	Factor de acoplamiento, reparación de transcripción	Infección pulmonar modelo murino.	(Wong et al., 2013)
<i>ruvB</i>	ADN helicasa B	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>ruvA</i>	Helicasa de ADN, proteína motora	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>ruvC</i>	Resolvasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>uvrD</i>	Helicasa II dependiente de ADN	Interacción con ADN, infección pulmonar modelo murino.	(Sharma & Rao, 2012; Wong et al., 2013)
<i>vals</i>	Valina ARNi ligasa	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>xerC</i>	Tirosina recombinasa específica de sitio	Recombinación ADN, formación biopelículas, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Marti et al., 2017; Neilson et al., 1999)
<i>xerD</i>	Tirosina recombinasa específica de sitio	Recombinación ADN, formación biopelículas, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Marti et al., 2017; Neilson et al., 1999)
<i>zapA</i>	Proteína de división celular	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
H11459	Factor sigma-70 de ARN polimerasa	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
Modificación de proteínas			
<i>dsbA</i>	Proteína de intercambio tiol/disulfuro	Formación de biopelícula, modelo de bacteriemia en rata	(Marti et al., 2017; Rosadimi et al., 2011)
<i>dsbB</i>	Proteína de formación de puentes disulfuro B	Protección oxidación, modelo bacteriemia en rata, infección oído medio en chinchilla, y pulmonar en modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Herbert et al., 2002; Mason et al., 2003; Segatori et al., 2006)

<i>pmbA</i>	Proteína peptidasa	Modelo bacteriemia en rata	(Herbert et al., 2002)
<i>ppiD</i>	Peptidil-profil cis-transisomerasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Wong et al., 2013)
<i>prc</i>	Proteasa carboxiterminal	Infección pulmonar modelo murino.	(Wong et al., 2013)
Estrés			
<i>oxyR</i>	Regulador transcripcional OxyR, proteína de unión a ADN	Protección frente estrés oxidativo, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Maciver & Hansen, 1996; Whiby et al., 2012)
<i>por</i>	Oxidoreductasa periplásmica	Competencia natural, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009; Tomb, 1992)
<i>relA</i>	DsbA	Competencia natural, infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
<i>relA</i>	GTP-fosfoquinasa	Infección pulmonar modelo murino.	(Gawronski et al., 2009)
Proteínas de unión a penicilinas			
<i>mrdA</i>	Proteína de unión a penicilina 2	Formación biopelículas.	(Martí et al., 2017)
<i>pbpG</i>	Proteína de unión a penicilina 7	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
<i>pbp2</i>	Proteína de unión a penicilina 2	Infección epitelio respiratorio.	(Gawronski et al., 2009)
<i>ponA</i>	Proteína de unión a penicilina 1A	Formación biopelículas.	(Martí et al., 2017)
<i>HI0364</i>	Proteína de unión a penicilina 7	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
Sistemas toxina-antitoxina			
<i>higA</i>	Sistema HigA-HigB, proteína A	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>higB</i>	Sistema HigA-HigB, proteína B	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>relB</i>	Sistema RelB-RelE, proteína B	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>relE</i>	Sistema RelB-RelE, proteína E	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>sibE</i>	Sistema SibD-SibE, proteína D	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>sibD</i>	Sistema SibD-SibE, proteína D	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>vapB1</i>	Sistema VapB1-VapC1, proteína B1	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>vapB2</i>	Sistema VapB2-VapC2, proteína B2	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>vapC1</i>	Sistema VapB1-VapC1, proteína C1	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
<i>vapC2</i>	Sistema VapB2-VapC2, proteína C2	Infección epitelio respiratorio.	(Baddal et al., 2015)
Proteínas hipotéticas			
<i>HI0094</i>	-	Infección oído medio en modelo de chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>HI0431</i>	-	Infección pulmonar modelo murino.	(Wong et al., 2013)
<i>HI0561</i>	-	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
<i>HI0665</i>	-	Infección oído medio en modelo de chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>HI0700</i>	-	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
<i>HI1018</i>	-	Modelo bacteriemia en rata.	(Herbert et al., 2002)
<i>HI1063</i>	-	Infección oído medio en modelo de chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>HI1064</i>	-	Infección oído medio en modelo de chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>HI1163</i>	-	Infección oído medio en modelo de chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>HI1292</i>	-	Infección oído medio en modelo de chinchilla.	(Mason et al., 2003)
<i>HI1427</i>	-	Infección pulmonar modelo murino.	(Mason et al., 2003)
<i>HI1598</i>	-	Modelo bacteriemia en rata.	(Wong et al., 2013)
<i>HI1605</i>	-	Infección pulmonar modelo murino.	(Herbert et al., 2002)
<i>R2866_1640</i>	-	Formación biopelículas.	(Wong et al., 2013)
			(Martí et al., 2017)

^aFunción asignada en base a homología de secuencia en NCBI.

^bNegrita, escrutinio *in vitro* y/o *in vivo* en el que el gen se identificó como factor de virulencia de HiNT.

Tabla A2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia	Capítulo/s
<i>H. influenzae</i>			
HiNT375	Cepa WT, aislado clínico de otitis media	(Hood et al., 1999a)	1 y 2
HiNT375 Δ <i>hbpA</i> -P791	<i>hbpA</i> :: <i>spec</i> , <i>Spec</i> ^R	Este estudio	1
HiNT375 Δ <i>luxCBA</i> -P682	<i>luxCBA</i> :: <i>spec</i> , <i>Spec</i> ^R	Este estudio	1
HiNT375 Δ <i>sapAB</i> -1665	<i>sapAB</i> :: <i>ermC</i> , <i>Erm</i> ^R	Este estudio	1
HiNT375 Δ <i>hbpA</i> -P896	<i>hbpA</i> :: <i>spec</i> , <i>Spec</i> ^R	Este estudio	1
HiNT375 Δ <i>hitBC</i> -P805	<i>hitBC</i> :: <i>ermC</i> , <i>Erm</i> ^R	Este estudio	1
HiNT375 Δ <i>pe</i> -P897	<i>pe</i> :: <i>spec</i> , <i>Spec</i> ^R	Este estudio	1
HiNT375 Δ <i>fur</i> -P584	<i>fur</i> :: <i>spec</i> , <i>Spec</i> ^R	Este estudio	1
RdKW20	Cepa de laboratorio WT, serotipo d sin cápsula	(Fleischmann et al., 1995)	1, 2 y 3
RdKW20Δ <i>luxCBA</i> -P683	<i>luxCBA</i> :: <i>spec</i> , <i>Spec</i> ^R	Este estudio	1
RdKW20Δ <i>sapAB</i> -P578	<i>sapAB</i> :: <i>ermC</i> , <i>Erm</i> ^R	Este estudio	1
RdKW20Δ <i>hbpA</i> -P885	<i>hbpA</i> :: <i>spec</i> , <i>Spec</i> ^R	Este estudio	1
RdKW20Δ <i>hitBC</i> -P804	<i>hitBC</i> :: <i>ermC</i> , <i>Erm</i> ^R	Este estudio	1
HiNT3655Δ <i>luxABCDEF</i> -P845	Cepa luminescente derivada del aislado clínico HiNT3655. Contiene una copia del operón <i>luxABCDEF</i> insertado en el genoma	(Al Jubair et al., 2014)	1
HiNT375Δ <i>thyA</i> -P525	<i>thyA</i> :: <i>ermC</i> , <i>Erm</i> ^R	Este estudio	2
HiNT375Δ <i>nupC</i> -P900	<i>nupC</i> :: <i>spec</i> , <i>Spec</i> ^R	Este estudio	2
RdKW20Δ <i>thyA</i> -P522	<i>thyA</i> :: <i>ermC</i> , <i>Erm</i> ^R	Este estudio	2
RdKW20Δ <i>nupC</i> -P891	<i>nupC</i> :: <i>spec</i> , <i>Spec</i> ^R	Este estudio	2
HiNT8233	Aislado HiNT de esputo de paciente EPOC, auxótrofo a timidina	Este estudio	2
Xen21 (RdKW20Δ <i>luxABCDEF</i>)-P871	Cepa luminescente derivada de RdKW20. Contiene una copia del operón <i>luxABCDEF</i> insertado en el genoma	PerkinElmer	3
<i>E. coli</i>			
TOP10	Usada para clonajes	ThermoFisher Scientific	1 y 2
SW102	Derivada de DY380, contiene un profago λ defectivo con proteínas <i>exo</i> , <i>bet</i> , y <i>gam</i> controladas por represor sensible a temperatura <i>cI857</i>	(Tracy et al., 2008)	1 y 2

Tabla A3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia	Capítulo/s
pJET1.2	Vector de clonaje	Thermofisher Scientific	1 y 2
pGEMT-easy	Vector de clonaje	Promega	1
pSBI-erm	Plásmido con <i>casette</i> Erm ^R	(Allen et al., 2005)	1 y 2
PRSM2832	Derivado de pKDI3, contiene <i>casette</i> Spec ^R flanqueado por regiones FRT	(Tracy et al., 2008)	1 y 2
pJET1.2- <i>hbpA</i>	pJET1.2 con un inserto de 3.270 pb que contiene el gen <i>hbpB</i> (1.532 pb, nt 362-1.894), <i>hbpA</i> (1.694 pb, nt 1-1.694) y región intergénica <i>hpbA</i> (44 pb)	Este estudio	1
pJET1.2- <i>hpbA</i> :: <i>spec</i>	pJET1.2- <i>hpbA</i> con un inserto de 3.913 pb que contiene el <i>casette</i> de disrupción <i>hpbA</i> :: <i>spec</i>	Este estudio	1
pJET1.2- <i>hxtCBA</i>	pJET1.2 con un inserto de 4.684 pb que contiene el gen <i>hxtC</i> (1.430 pb, nt 701-2.130), <i>hxtB</i> (1.698 pb, nt 1-1.698), <i>hxtA</i> (1.470 pb, nt 1-1.470) y las regiones intergénicas (75 y 111 pb, respectivamente)	Este estudio	1
pJET1.2- <i>hxtCBA</i> :: <i>spec</i>	pJET1.2- <i>hxtCBA</i> con un inserto de 3.864 pb que contiene el <i>casette</i> de disrupción <i>hxtCBA</i> :: <i>spec</i>	Este estudio	1
pGEMT- <i>sapAB</i>	pGEMT-easy con inserto de 2.340 pb que contiene el gen <i>sapA</i> (1.698 pb, nt 1-1.698), <i>sapB</i> (423 pb, nt 1-423) y la región flanqueante de <i>sapA</i> aguas arriba (220 pb)	Este estudio	1
pGEMT- <i>sapAB</i> :: <i>ermC</i>	pGEMT- <i>sapAB</i> con un inserto de 3.360 pb que contiene el <i>casette</i> de disrupción <i>sapAB</i> :: <i>ermC</i>	Este estudio	1
pJET1.2- <i>hbpA</i>	pJET1.2 con un inserto de 3.583 pb que contiene el gen <i>hbpA</i> (1.650 pb) y las regiones flanqueantes aguas arriba (937 pb) y aguas abajo (996 pb)	Este estudio	1
pJET1.2- <i>hbpA</i> :: <i>spec</i>	pJET1.2- <i>hbpA</i> con un inserto de 4.012 pb que contiene el <i>casette</i> de disrupción <i>hbpA</i> :: <i>spec</i>	Este estudio	1
pJET1.2- <i>hitBC</i>	pJET1.2 con un inserto de 1.742 pb que contiene el gen <i>hitA</i> (102 pb, nt 898-999), <i>hitB</i> (668 pb, nt 1-668 pb) and <i>hitC</i> (855 pb, nt 2011-1.055 pb), y la región intergénica <i>hitAB</i> (117 pb)	Este estudio	1
pJET1.2- <i>hitBC</i> :: <i>ermC</i>	pJET1.2- <i>hitBC</i> con un inserto de 2.922 pb que contiene el <i>casette</i> de disrupción <i>hitBC</i> :: <i>ermC</i>	Este estudio	1
pJET1.2- <i>hpe</i>	pJET1.2 con un inserto de 3.449 pb que contiene el gen <i>hpe</i> (483 pb) y regiones flanqueantes aguas arriba (1.400 pb) y aguas abajo (1.497 pb)	Este estudio	1
pJET1.2- <i>hpe</i> :: <i>spec</i>	pJET1.2- <i>hpe</i> con un inserto de 5.036 pb que contiene el <i>casette</i> de disrupción <i>hpe</i> :: <i>spec</i>	Este estudio	1
pJET1.2- <i>fur</i>	pJET1.2 con un inserto de 2.441 pb que contiene el gen <i>fur</i> (441 pb) y regiones flanqueantes de 1 kb	Este estudio	1
pJET1.2- <i>fur</i> :: <i>spec</i>	pJET1.2- <i>fur</i> con un inserto de 4.091 pb que contiene el <i>casette</i> de disrupción <i>fur</i> :: <i>spec</i>	Este estudio	1
pJET1.2- <i>hlyA</i>	pJET1.2 con un inserto de 2.852 pb que contiene el gen <i>hlyA</i> (852 pb) y regiones flanqueantes de 1 kb	Este estudio	2
pJET1.2- <i>hlyA</i> :: <i>ermC</i>	pJET1.2 con un inserto de 3.814 pb que contiene el <i>casette</i> de disrupción <i>hlyA</i> :: <i>ermC</i>	Este estudio	2
pJET1.2- <i>nupC</i>	pJET1.2 con un inserto de 2.664 pb que contiene el gen <i>nupC</i> (1.254 pb) y regiones flanqueantes de ~700 pb	Este estudio	2
pJET1.2- <i>nupC</i> :: <i>spec</i>	pJET1.2 con un inserto de 3.501 pb que contiene el <i>casette</i> de disrupción <i>nupC</i> :: <i>spec</i>	Este estudio	2
pGSF8	Vector con transposón <i>MarinerT7</i> con diamas de restricción <i>MmeI</i> en sus regiones invertidas y <i>casette</i> Spec ^R	Este estudio	3

Tabla A4. Cebadores utilizados en este trabajo.

Cebador	ID	Secuencia (5'-3')	Propósito	Referencia	Capítulo/s
<i>tlpB4-F1</i>	1286	CATTACAAGACCCCAATTTACAAA	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>tlpB4-R1</i>	1287	GGAGTACCTTGATTAATTCACAATG	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>tlpB4-F2</i>	1288	GAGTAAACATACGATATGGAAATAAAACCTATAAAGT	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>tlpB4-R2</i>	1289	AGAACAIGTTATCCGGGATCCGTCGACC TCTTCCATCACAAAGTATGCATAGATCCACTCTCTTTTGGC GATTAAIGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hvxCB4-F1</i>	1280	AATATCCACCACCGGAAACTCGTT	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hvxCB4-R1</i>	1281	GTTATCGTAGTCGCTTCTATGAC	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hvxCB4-F2</i>	1282	CCGCAATCTACATTTTGTATAGCCTGTTTAAACAAAGGCGA TAAATTCATCCGGGATCCGTCGACC	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hvxCB4-R2</i>	1283	AGGATAAATATACITTTGCCATTTTAAACGTTAAATTTTCCCTCT TTATGTATATGAGGCTGGAGCTGCTTCG	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>sapAB-F1</i>	469	AATGTTGATTAATGGAGAGAAGTTGAT	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>sapAB-R1</i>	470	TTCCEAATGTGAGACCGCGCAACATA	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>sapAB-F2</i>	471	CAACTGTGTCAATAACATATTCCTGAAG	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>sapAB-R2</i>	472	ATAAGCCAATTTGGCTTACTTCAGGATAAG	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hbp4-F1</i>	1499	GTTTTTACTCTTTGCAATGGGGTTAGT	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hbp4-R1</i>	1501	AAACAAAAGGGTGAATATAAATTTACA	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hbp4-F2</i>	1503	TTFAACCATAAATGTTAGGGCAATCCCTGGCTAACATTGA GGTATGCTATGATCCGGGATCCGTCGACC	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hbp4-R2</i>	1504	ATAAAAAGCCCTTATAAATAAGGCTTAAAATAAAGTAAA TCAAATAGAAATATGATAGGCTGGAGCTGCTTCG	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hitBC-F1</i>	1373	CTTGAACTTATGAAAATTAAGAAGCAC	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hitBC-R1</i>	1374	CGGGTACCACGGCGGATAATAATGCCAGCAG	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hitBC-F2</i>	1375	CGGGTACCACGGGTTAATTTTGGCGAGAAT	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hitBC-R2</i>	1278	TAAGGTTAAAAGGCCCTTTCTA	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hpe-F1</i>	1501	CGTGTGATGACATCGCTTGTGACTTA	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hpe-R1</i>	1502	AGCGACTGCTTCATATTCGCGCGTAA	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hpe-F2</i>	1505	CACACTGTAATAATCTAGAATAATGTCAGCTAACATAAG GAGTAAATAATGATCCGGGATCCGTCGACC	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>hpe-R2</i>	1506	GCACCTAAAATAATGATTAATAATAACTAAATAAAGGTG CAGATTTTATGATAGGCTGGAGCTGCTTCG	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>fur-F1</i>	1173	CGTCAGCAAGCCAAACCGAATTTTA	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>fur-R1</i>	1174	AACTTATCTCACGTAAGAGCGTG	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>fur-F2</i>	1201	CTTAGCTGAATTTGGCTTAGTATGTTGTGCATATAGGAAG AAAAATATGATTCGGGGATCCGTCGACC	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>fur-R2</i>	1202	AGCGCACATTTTCGCTTAGATAATTAATTTTGAATT GTTTCGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Inactivación génica	Este estudio	1
<i>pSBLerm_up</i>	1306	ATAAAGAGGTTATAATGAACGAG	Inactivación génica	Este estudio	1 y 2
<i>pSBLerm_down</i>	1307	GGTACACGAAAAACAAGTAAAGGG	Inactivación génica	Este estudio	1 y 2
<i>tlpBqPCR-F3</i>	1471	AAAGTAAGAGATCGTAAAGATAATGAAGTAACTG	qRT-PCR	(Whitby et al., 2013)	1
<i>tlpBqPCR-R3</i>	1472	ACCGGACCTTGTCTACAAC	qRT-PCR	(Whitby et al., 2013)	1
<i>hvu4qPCR-F</i>	1661	ACCCAAGGACGAGAATAAATG	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>hvu4qPCR-R</i>	1662	TCGCCATTAAGTACCAGAA	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>sap4qPCR-F2</i>	1621	GATTCATCTGGTTGGTTAGCTGGTAA	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>sap4qPCR-R2</i>	1622	AGGTGGTAAATGGCACGATTC	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>hbp4qPCR-F2</i>	1613	CTGGATCGTACGGATAAATCTTGG	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>hbp4qPCR-R2</i>	1614	AAGGCCAGGAATATCAGCTAA	qRT-PCR	Este estudio	1

<i>hit8q</i> PCR-F3	1631	AAGTGGGGTGGATTTCAG	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>hit8q</i> PCR-R3	1630	CAAACTAATGGCAAGGCACA	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>hpaq</i> PCR-F2	1609	ATTATCACTGGTTACTTACTGCCGTG	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>hpaq</i> PCR-R2	1610	ACGTATATCCGCTTCGTACATCAG	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>farq</i> PCR-F	1410	GGCGATATGTAATCCGTCA	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>farq</i> PCR-R	1411	TGATTTACAGCTGACCGTTGT	qRT-PCR	Este estudio	1
<i>I6sr</i> RM4-F1	1074	GGCGTTGATGACCGTGAAC	qRT-PCR	Este estudio	1 y 2
<i>I6sr</i> RM4-R1	1075	GCCAGTAATAATGCCCTCTCTAG	qRT-PCR	Este estudio	1 y 2
<i>thy4</i> -F1	1294	TGCCGAAATTCGCTCGGTTACATTTA	Inactivación génica	Este estudio	2
<i>thy4</i> -R1	1295	GATGATACCTAAAAGTAATCCGACCAAAAAATTCGG	Inactivación génica	Este estudio	2
<i>thy4</i> -F2	1300	CGTTCCTGTGATGTTCCGGCTTGG	Inactivación génica	Este estudio	2
<i>thy4</i> -R2	1301	ATATCAATCAAGCCTCTACGATGC	Inactivación génica	Este estudio	2
<i>thy4</i> Pro_F	-	TCACCTAAGCTTCCGGCTTT	Inactivación génica	Este estudio	2
<i>nupC</i> -R1	1519	ATGAAAGGTTATGGAGGAGTTCAT	Inactivación génica	Este estudio	2
<i>nupC</i> -R2	1520	GTGAGTACGAAATAATGGTCAACACCGGT	Inactivación génica	Este estudio	2
<i>nupC</i> -R1	1521	GTAGAATAAGCCGAATTTTAACTTAACATACTAGGG	Inactivación génica	Este estudio	2
<i>nupC</i> -F2	1522	GAATCAATGATTCGGGGATCCGTCGACC	Inactivación génica	Este estudio	2
<i>nupC</i> -F2	1522	TACCCGACTTTTAAATTTGATTAAAGATAAAATTAAGTGGCTG	Inactivación génica	Este estudio	2
<i>nupC</i> -qRT-F2	1454	CAGCACCTAAAGCCTGGCTGGAGCTGCTTCG	qRT-PCR	Este estudio	2
<i>nupC</i> -qRT-R2	1455	ATGTTAATCGCATTCGTTGGTT	qRT-PCR	Este estudio	2
<i>tdk</i> -RT-Fw	1394	ATTTGCTCTGCAATACCCTGTT	qRT-PCR	Este estudio	2
<i>tdk</i> -RT-Rv	1395	TGTGCTTTGTTATGGCTTGC	qRT-PCR	Este estudio	2
<i>tdk</i> -RT-Rv	1395	CTTTAATGACCTCGCCCTGA	qRT-PCR	Este estudio	2
rGAPDHqPCR-F	1430	CCCAATAACATCAAAATGGGG	qRT-PCR	Este estudio	3
rGAPDHqPCR-F	1431	CTTCCACAAATGCCAAAGTT	qRT-PCR	(Regueiro et al., 2011)	3
KCqPCR-F	1404	GACAGACTGCTGTATGGGA	qRT-PCR	(Euba et al., 2017)	3
KCqPCR-R	1405	TGCACCTCTTTCCGACAAAC	qRT-PCR	(Euba et al., 2017)	3
mTNE-F	1592	AGGCATCCCCCAAAAAGA	qRT-PCR	(Euba et al., 2017)	3
mTNE-R	1593	GCCTCCACTTGTGGT	qRT-PCR	(Euba et al., 2017)	3
rSirt1qPCR-F	1408	GGGTTTGTCTCCCTGTGGG	qRT-PCR	Este estudio	3
rSirt1qPCR-R	1409	ATTCCTGACACCTGCTCCAA	qRT-PCR	Este estudio	3
mr2qPCR-F	1402	CCAGCACATCCAGACAGACA	qRT-PCR	Este estudio	3
mr2qPCR-R	1403	GAGCTATTGAGGGAATGGG	qRT-PCR	Este estudio	3
MMP2-qPCR-F	1709	CGATGTCGCCCTTAAACAG	qRT-PCR	Este estudio	3
MMP2-qPCR-F	1710	CTTAGGGTATCTTTCAGCAAAA	qRT-PCR	(Eurlings et al., 2014)	3
MMP12-qPCR-F	1713	TGAGGCAGAAACGTGGACTAAA	qRT-PCR	(Eurlings et al., 2014)	3
MMP12-qPCR-F	1714	ATTGACTTTGGATTATTGGAAATGCT	qRT-PCR	(Eurlings et al., 2014)	3
Mariner-Tn-F	1653	ACAGTTGGATGATAAGTCCCGGTCT	Chequeo Tn-Mariner	Este estudio	3
Mariner-Tn-R	1654	ACAGTTGGATGATAAGTCCCGGTCT	Chequeo Tn-Mariner	Este estudio	3
PBGSF29 ATCACG-F*	-	TTCCCTACACGAGCTCTCCGATCTACAGNN	In-seq, adaptador A	Este estudio	3
PBGSF30 ATCACG-R	-	CGTATFAGATCGGAAAGCGCTGTAGGAAAAGAT	Dr. Langereis, Radboundumc	Este estudio	3
PBGSF29 CGATGT-F	-	TTCCCTACACGAGCTCTCCGATCTCAGTNN	Dr. Langereis, Radboundumc	Este estudio	3
PBGSF30 CGATGT-R	-	ACATCGAGATCGGAAAGCGCTGTAGGAAAAGAT	Dr. Langereis, Radboundumc	Este estudio	3
PBGSF29 TTAGGC-F	-	TTCCCTACACGAGCTCTCCGATCTTAGGNN	Dr. Langereis, Radboundumc	Este estudio	3
PBGSF30 TTAGGC-R	-	GCCTAAAGATCGGAAAGCGCTGTAGGAAAAGAT	Dr. Langereis, Radboundumc	Este estudio	3
PBGSF29 TGACCA-F	-	TTCCCTACACGAGCTCTCCGATCTTACCANN	Dr. Langereis, Radboundumc	Este estudio	3
PBGSF30 TGACCA-R	-	TGTCAAAGATCGGAAAGCGCTGTAGGAAAAGAT	Dr. Langereis, Radboundumc	Este estudio	3

PBGSF29 ACAGTG-F	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACAGTGN	Tn-seq, adaptador E	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 ACAGTG-R	-	CACTGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGT	Tn-seq, adaptador E	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 GCCAAT-F	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGCCAATNN	Tn-seq, adaptador F	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 GCCAAT-R	-	ATGGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador F	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 CAGATC-F	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCAGATCNN	Tn-seq, adaptador G	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 CAGATC-R	-	GATCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGT	Tn-seq, adaptador G	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 ACTTGA-F	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACTTGAN	Tn-seq, adaptador H	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 ACTTGA-R	-	TCAGTATGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador H	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 GATCAG-F	-	CTGATCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador I	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 GATCAG-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGCTNN	Tn-seq, adaptador J	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 TAGCTT-F	-	AAGCTAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGT	Tn-seq, adaptador J	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 TAGCTT-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGCTACNN	Tn-seq, adaptador K	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 GGCTAC-F	-	GTAGCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador K	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 GGCTAC-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTTANN	Tn-seq, adaptador L	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 CTGTGA-F	-	TACAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGT	Tn-seq, adaptador L	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 CTGTGA-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGTCAANN	Tn-seq, adaptador M	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 AGTCAA-F	-	TTGACTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGT	Tn-seq, adaptador M	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 AGTCAA-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGTTCNN	Tn-seq, adaptador N	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 AGTTCF-F	-	GGAACTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGT	Tn-seq, adaptador N	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 AGTTCF-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTATGTCANN	Tn-seq, adaptador O	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 ATGTCA-F	-	TGACATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGT	Tn-seq, adaptador O	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 ATGTCA-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTGAAANN	Tn-seq, adaptador P	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 CCGTCC-F	-	GGACGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador P	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 CCGTCC-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTCGCNN	Tn-seq, adaptador Q	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 GTCCGG-F	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTCGCNN	Tn-seq, adaptador Q	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 GTCCGG-R	-	GGGACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGT	Tn-seq, adaptador R	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 GTGAAA-F	-	TTTCACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGT	Tn-seq, adaptador R	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 GTGAAA-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTGGCCNN	Tn-seq, adaptador S	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 GTGGCC-F	-	GGCCACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador S	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 GTGGCC-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTTCGNN	Tn-seq, adaptador T	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 GTTTCG-F	-	CGAAACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador T	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 GTTTCG-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTACGNN	Tn-seq, adaptador U	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 GATTCG-F	-	CGTACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador U	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 GATTCG-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGATGGNN	Tn-seq, adaptador V	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 GATGGG-F	-	CCACTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador V	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 GATGGG-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACTGANN	Tn-seq, adaptador W	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 ACTGAT-F	-	ATCAGTATGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador W	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 ACTGAT-R	-	TTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTATTCCTNN	Tn-seq, adaptador X	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF29 ATTCCF-F	-	AGGAATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAAGAGT	Tn-seq, adaptador X	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF30 ATTCCF-R	-	CAAGCAGACGACGGCATACAGATAGACCCGGGACTTAT	Tn-seq, adaptador X	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF23_NextSeq	-	GATCCAACTGT	Tn-seq, PCR Illumina	Dr. Langereis, Radboundumc	3
PBGSF31	-	AAATGATACGGCGCACCCGAGATCTACACTCTTCCCTAC	Tn-seq, PCR Illumina	Dr. Langereis, Radboundumc	3
	-	ACGACGCTCTCCGATCT			

F, cebador directo; R, cebador reverso.

*Negrita, secuencia de nucleótidos del *baricitide* (6pb) de los adaptadores utilizados en Tn-seq; sombreado gris, secuencia común de los adaptadores, amplificada por el cebador PBGSF31; sombreado verde, secuencia final del Tn-seq, amplificada por el cebador PBGSF23_NextSeq.

Tabla A5. Medio mínimo químicamente definido (CDMM): composición y preparación.

Solución 1 (Volumen final: 1000 ml)	
Ácido L-Aspártico	5 gr
Ácido L-Glutámico	13 gr
NaCl ^a	58 gr
K ₂ SO ₄ ^b	10 gr
MgCl ₂ ^c	2 gr
CaCl ₂ ^d	0.222 gr
Etilendiaminotetraacetato	0.037 gr
NH ₄ Cl ^e	2.2 gr
H ₂ O ^d	800 ml
Ajustar pH a 7.2 con 11.8 ml de 10 N ^o NaOH ^b . Añadir H ₂ O ^d hasta 1000 ml.	
Autoclavar y guardar a 4°C	
Solución 2 (2.1+2.1+2.3) (1:1:1)	
Solución 2.1 (Volumen final: 100 ml)	
L-Arginina	1.5 gr
Glicina	0.15 gr
L-Lisina	0.25 gr
L-Metionina	0.5 gr
L-Serina	0.5 gr
Añadir 100 ml 0.1N HCl. Esterilizar mediante filtración y guardar a 4°C.	
Solución 2.2 (Volumen final: 100 ml)	
L-Leucina	1.5 gr
Disolver en 100 ml de HCl 0.1N. Esterilizar mediante filtración y guardar a 4°C.	
Solución 2.3 (Volumen final: 100 ml)	
L-Tirosina	1 gr
Disolver en 20 ml de HCl 1N y añadir inmediatamente dH ₂ O hasta 100 ml.	
Esterilizar mediante filtración y guardar a 4°C.	
Solución 3 (Volumen final: 5 ml)	
Tween-80	50 µl (0.1% vol/vol) ⁱ
Alcohol de polivinilo	5 mg (0.1% p/vol)
Lactato sódico	200 mg
Glicerol	0.75 ml (15% vol/vol)
Añadir H ₂ O ^d hasta 5 ml. Esterilizar mediante filtración y guardar a 4°C.	
Solución 4 (Volumen final: 100 ml)	
Uracilo	0.2 gr
Hipoxantina	0.04 gr
Disolver en 100 ml de HCl 0,1N. Esterilizar mediante filtración y guardar a 4°C.	
Solución 5 (Volumen final: 100 ml)	
Inosina	1 gr
K ₂ HPO ₄ ^j	1.74 gr
KH ₂ PO ₄ ^k	1.36 gr
Añadir H ₂ O ^d hasta 100 ml. Esterilizar mediante filtración y guardar a 4°C.	
Solución 6 (Volumen final: 100 ml)	
Hemina	0.1 gr
L-Histidina	0.1 gr
2,2',2''-nitilotrietanol	4 ml (4% vol/vol)
Añadir dH ₂ O hasta 100 ml. Esterilización: 70°C durante 10 min.	
Guardar a 4°C (sólo 2-3 semanas)	
Solución 7 (Volumen final: 10 ml)	
NAD	0.1 gr
Tiamina	0.1 gr
Pantotenato de calcio	0.1 gr
Añadir H ₂ O ^d hasta 100 ml. Esterilizar mediante filtración y guardar a -20°C.	

Preparación de CDMM

1. Mezclar para un volumen final de 100 ml de CDMM (antes de usar)

Solución 1 10 ml

Solución 2 (2.1+2.2+2.3) (1:1:1) 6 ml

Solución 3 2 ml

Solución 4 5 ml

Añadir 2.6 ml de NaOH 1N y 52.4 ml de H₂O_d

Solución 5 20 ml

Solución 6 1 ml

Solución 7 0.4 ml

Ajustar a pH 7.0

2. Cuando sea necesario, añadir 50 μ M cistina o 50 μ M GSSG

^aNaCl, cloruro de sodio; ^bK₂SO₄, sulfato de potasio; ^cMgCl₂, cloruro de magnesio; ^dCaCl₂, cloruro de calcio; ^eNH₄Cl, cloruro de amonio; ^fH₂O_d, agua destilada; ^gN, normal; ^hNaOH, hidróxido de sodio; ⁱvol/vol, volumen/volumen; ^jK₂HPO₄, fosfato dipotásico; ^kKH₂PO₄, fosfato monopotásico.

Tabla A6. Estadística detallada de las soluciones HADDOCK de la interacción de hemina con las proteínas de HiNT HbpA, SapA, SapA-variate truncada, PE y HxuA.

<i>H. influenzae</i> HbpA				
	Clúster 1	Clúster 2	Clúster 3	Clúster 4
HADDOCK	164.2±1.6	157.8±2.8	153.7±9.7	151.7±10.4
Tamaño Cluster	36	90	12	26
RMSD (Å)	0.5±0	0.5±0	0.5±0	0.4±0.2
Energía Van der Waals	-39.5±5.1	-33.6±4.4	-40.6±11.5	-46.4±3.9
Energía Electroestática	-197.8±10.7	-216.4±25	-213.7±38.8	-106.3±59.0
Energía de desolvatación	-91.9±5.8	-89.7±7.9	-82.6±6.7	-88.9±5.0
Energía de restricción	68.0±26.3	88.3±25.8	122.6±36.9	48.4±18.0
Área de superficie (Å ²)	1081±88.6	1029.3±64.9	1075.2±89.8	973.3±17.8
Z	-1.1	-0.8	-0.6	-0.5
<i>H. influenzae</i> SapA				
	Clúster 1	Clúster 2	Clúster 3	Clúster 4*
HADDOCK	-145.2±3.3	-133.1±3.5	-129.0±5.1	-112.0±22.1
Tamaño Cluster	57	43	20	4
RMSD (Å)	0.5±0.3	0.6±0.1	0.7±0.0	0.6±0.0
Energía Van der Waals	-30.6±2.5	-44.8±2.1	-44.8±6.5	-28.6±5.6
Energía Electroestática	-250.1±14.1	-116.5±42.4	-122.8±61.2	-163.8±131.8
Energía de desolvatación	-71.8±4.1	-67.8±6.9	-64.7±7.0	-60.6±5.0
Energía de restricción	71.9±38.2	28.8±16.0	50.7±14.6	99.3±37.7
Área de superficie (Å ²)	984.3±68.8	1136.1±15.7	1115.1±52.7	887.9±96.5
Z	-1.7	-1.2	-1.0	-0.2
<i>H. influenzae</i> SapA truncada				
	Clúster 1	Clúster 2	Clúster 3	Clúster 4
HADDOCK	-136.1±5.0	-120.8±6.3	-115.2±7.0	-86.5±5.1
Tamaño Cluster	120	11	37	8
RMSD (Å)	0.4±0.2	0.6±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0
Energía Van der Waals	-32.0±8.6	-39.7±6.2	-142.8±13.9	-26.9±6.3
Energía Electroestática	224.7±46.5	-134.7±36.2	-51.9±10.4	-22.6±11.6
Energía de desolvatación	-65.8±5.6	-57.1±6.4	-51.9±10.4	-57.6±8.2
Energía de restricción	65.6±38.1	28.8±16.1	13.3±20.0	24.5±24.4
Área de superficie (Å ²)	951.4±173.4	1089.7±86.4	1104.9±53	769.5±148.5
Z	-1.2	-0.3	0.0	1.6
<i>H. influenzae</i> PE				
	Clúster 1	Clúster 2		
HADDOCK	-66±1.0	-43.4±10.5		
Tamaño Cluster	189	6		
RMSD (Å)	1.1±0.2	1.1±0.1		
Energía Van der Waals	-40.8±5.2	-36.8±4.1		
Energía Electroestática	-63.3±15.2	-46.6±18.5		
Energía de desolvatación	-13.8±7.2	1.3±6.3		
Energía de restricción	11.8±11.0	14.9±11.0		
Área de superficie (Å ²)	1147.0±72.4	1077.1±45.3		
Z	-1.0	1.0		
<i>H. influenzae</i> HxuA				
	Clúster 1	Clúster 2	Clúster 3	Clúster 4
HADDOCK	40.2±3.4	-35.0±7.1	-13.6±10.7	-2.8±17.2
Tamaño Cluster	138	35	8	4
RMSD (Å)	0.4±0.3	0.5±0.1	0.4±0.0	0.5±0.0
Energía Van der Waals	-40.0±4.7	-40.6±5.1	-21.5±4.7	-25.2±9.7
Energía Electroestática	-202.6±23.5	-111.3±41.0	188.1±55.6	-104.8±7.8
Energía de desolvatación	37.9±3.1	27.0±5.8	39.6±1.4	40.4±13.2
Energía de restricción	24.3±18.2	8.5±4.2	59.6±17.5	29.4±13.4
Área de superficie (Å ²)	923.5±15.5	1021.2±45.7	671.6±66.3	723.5±92.2
Z	-1.4	-1.1	0.0	0.6

*Las energías se muestran en kcal/mol.

Anexo II

Publicaciones

Rodríguez-Arce, I., Marti, S., Euba, B., Fernandez-Calvet, A., Moleres, J., Lopez-Lopez, N., Barberan, M., Ramos-Vivas, J., Tubau, F., Losa, C., et al. (2017). Inactivation of the Thymidylate Synthase *thyA* in non-typeable *Haemophilus influenzae* modulates antibiotic resistance and has a strong impact on its interplay with the host airways. *Front Cell Infect Microbiol*, 7: 266. doi: 10.3389/fcimb.2017.00266. **El contenido de esta publicación se recoge íntegramente en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral.**

Euba, B., Lopez-Lopez, N., **Rodríguez-Arce, I.**, Fernandez-Calvet, A., Barberan, M., Caturla, N., Marti, S., Diez-Martinez, R. & Garmendia, J. (2017). Resveratrol therapeutics combines both antimicrobial and immunomodulatory properties against respiratory infection by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Sci Rep*, 7 (1): 12860. doi: 10.1038/s41598-017-13034-7.

Fernandez-Calvet, A., **Rodríguez-Arce, I.**, Almagro, G., Moleres, J., Euba, B., Caballero, L., Marti, S., Ramos-Vivas, J., Bartholomew, T. L., Morales, X., et al. (2018). Modulation of *Haemophilus influenzae* interaction with hydrophobic molecules by the VacJ/MlaA lipoprotein impacts strongly on its interplay with the airways. *Sci Rep*, 8 (1): 6872. doi: 10.1038/s41598-018-25232-y.

Moleres, J., Fernández-Calvet, A., Ehrlich, R.L., Martí, S., Pérez-Regidor, L., Euba, B., **Rodríguez-Arce, I.**, Balashov, S., Cuevas, E., Liñares, J., Ardanuy, C., Martín-Santamaría, S., Ehrlich, G. D., Mell, J. C. & Garmendia, J. Antagonistic pleiotropy in the bifunctional surface protein FadL (OmpP1) during adaptation of *Haemophilus influenzae* to chronic lung infection associated with chronic obstructive pulmonary Disease. *MBio*, 9:e01176-18. doi: 10.1128/mBio.01176-18.



Inactivation of the Thymidylate Synthase *thyA* in Non-typeable *Haemophilus influenzae* Modulates Antibiotic Resistance and Has a Strong Impact on Its Interplay with the Host Airways

Irene Rodríguez-Arce¹, Sara Martí^{2,3}, Begoña Euba^{1,2}, Ariadna Fernández-Calvet¹, Javier Moleres¹, Nahikari López-López¹, Montserrat Barberán⁴, José Ramos-Vivas^{5,6}, Fe Tubau^{2,3}, Carmen Losa⁷, Carmen Ardanuy^{2,3}, José Leiva⁷, José E. Yuste^{2,8} and Junkal Garmendia^{1,2*}

¹ Instituto de Agrobiotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Pública Navarra-Gobierno, Navarra, Spain, ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain, ³ Departamento Microbiología, Hospital Universitari Bellvitge, University of Barcelona, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, Barcelona, Spain, ⁴ Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, ⁵ Servicio Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla and Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, ⁶ Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ⁷ Servicio de Microbiología, Clínica Universidad de Navarra, Navarra, Spain, ⁸ Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

W. Edward Swords,
Wake Forest University, United States

Reviewed by:

Sandy Wong,
University of Mississippi Medical
Center School of Dentistry,
United States
Christian Berens,
Friedrich Loeffler Institute Greifswald,
Germany

*Correspondence:

Junkal Garmendia
junkal.garmendia@unavarra.es

Received: 01 December 2016

Accepted: 02 June 2017

Published: 20 June 2017

Citation:

Rodríguez-Arce I, Martí S, Euba B, Fernández-Calvet A, Moleres J, López-López N, Barberán M, Ramos-Vivas J, Tubau F, Losa C, Ardanuy C, Leiva J, Yuste JE and Garmendia J (2017) Inactivation of the Thymidylate Synthase *thyA* in Non-typeable *Haemophilus influenzae* Modulates Antibiotic Resistance and Has a Strong Impact on Its Interplay with the Host Airways. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:266. doi: 10.3389/fcimb.2017.00266

Antibacterial treatment with cotrimoxazol (TxS), a combination of trimethoprim and sulfamethoxazole, generates resistance by, among others, acquisition of thymidine auxotrophy associated with mutations in the thymidylate synthase gene *thyA*, which can modify the biology of infection. The opportunistic pathogen non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is frequently encountered in the lower airways of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, and associated with acute exacerbation of COPD symptoms. Increasing resistance of NTHi to TxS limits its suitability as initial antibacterial against COPD exacerbation, although its relationship with thymidine auxotrophy is unknown. In this study, the analysis of 2,542 NTHi isolates recovered at Bellvitge University Hospital (Spain) in the period 2010–2014 revealed 119 strains forming slow-growing colonies on the thymidine low concentration medium Mueller Hinton Fastidious, including one strain isolated from a COPD patient undergoing TxS therapy that was a reversible thymidine auxotroph. To assess the impact of thymidine auxotrophy in the NTHi-host interplay during respiratory infection, *thyA* mutants were generated in both the clinical isolate NTHi375 and the reference strain RdKW20. Inactivation of the *thyA* gene increased TxS resistance, but also promoted morphological changes consistent with elongation and impaired bacterial division, which altered *H. influenzae* self-aggregation, phosphorylcholine level, C3b deposition, and airway epithelial infection patterns. Availability of external thymidine contributed to overcome such auxotrophy and TxS effect, potentially facilitated by the nucleoside transporter *nupC*. Although, *thyA* inactivation resulted in bacterial attenuation in a lung infection mouse model, it

also rendered a lower clearance upon a TxS challenge *in vivo*. Thus, our results show that thymidine auxotrophy modulates both the NTHi host airway interplay and antibiotic resistance, which should be considered at the clinical setting for the consequences of TxS administration.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, thymidylate synthase, thymidine auxotrophy, thymidine uptake, bacterial morphology, antibiotic resistance, airway infection

INTRODUCTION

Non-typeable (non-capsulated) *Haemophilus influenzae* (NTHi) is a Gram negative coccobacillus that is a common commensal in the nasopharynx of healthy humans, and also an opportunistic pathogen causing respiratory infections such as acute otitis media, otitis media with effusion, community-acquired pneumonia, and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD; Agrawal and Murphy, 2011). COPD is characterized by a progressive and not fully reversible airflow limitation, accompanied by infiltration of the airways by neutrophils and mucus hypersecretion (Barnes, 2016). The chronic course and evolution of COPD is often characterized by periods of symptom exacerbation with a negative impact on the patient's quality of life and evolution of the disease, and represent a significant cause of medical intervention and hospitalization. Given that acute exacerbations of COPD (AECOPD) are mostly caused by bacterial and viral infections (Sethi, 2010), antibiotic therapy is routinely prescribed. Use of amoxicillin, tetracyclines, or cotrimoxazole (TxS), a combination of trimethoprim (TMP) and sulfamethoxazole (SMX), has long been regarded as standard therapy for patients with AECOPD, which has contributed to the increasing emergence of resistance to these antibiotics in common respiratory pathogens such as NTHi, and become a real challenge in the choice of adequate antibacterials (Nouira et al., 2010).

The treatment of respiratory infections has been a very important field of use of TxS, as a first-line agent against *H. influenzae* infected respiratory patients (Iyer Parameswaran and Murphy, 2009), and has also been considered as a prophylactic option in HIV-infected children therefore having an impact on *H. influenzae* carriage (Grant et al., 2009; Mwenya et al., 2010), altogether increasing TxS resistance levels in this pathogen. TxS interferes with the bacterial metabolism and replication by blocking the production of tetrahydrofolic acid (THF). THF is a co-factor for the thymidylate synthase, an essential protein encoded by the *thyA* gene, required for the conversion of thymidine from uracil (Stryer, 1995). During normal metabolism, dihydrofolate is reduced to THF by the dihydrofolate reductase (DHFR), encoded by the *folH* gene, also known as *drfA* and *folA*. TMP is a substrate analog of dihydrofolate and blocks its reduction to THF. Conversely, SMX is a substrate analog of *para*-aminobenzoic acid, and blocks the *folP* gene encoding the dihydropteroate synthetase DHPS, which is involved in production of dihydropteroate, a precursor of dihydrofolate. Both TMP and SMX have little toxicity to humans because humans do not synthesize folic acid but obtain it from dietary sources (Tristram et al., 2007). Inhibiting the production of THF

prevents thymine synthesis and, hence, DNA replication, causing bacterial death and TxS susceptibility. However, if external thymidine is available, as shown in infected tissues (Besier et al., 2008), thymidine-dependent TxS resistance may emerge upon treatment. This aspect has been long reported (Maskell et al., 1978), and extensively analyzed in *Staphylococcus aureus*, where the underlying mechanism for thymidine dependency relies on mutations of the *thyA* gene. Thus, inactivation of the *thyA* gene generates thymidine auxotroph small colony variants (SCVs) with a strong impact in this pathogen's physiology, virulence, and persistence, and uptake of external thymidine by the *S. aureus* NupC nucleoside transporter seems to bypass the effect of TxS (Kriegeskorte et al., 2014).

In NTHi, resistance to TxS is associated to polymorphisms and/or short insertions in the *folH* and *folP* genes, DHFR overproduction, or acquisition of the sulfonamide (SUL) genes *sul1* and *sul2* (de Groot et al., 1988, 1996; Enne et al., 2002). Existing evidence also relates *H. influenzae* TMP resistance to transient thymidine auxotrophy in isolates from sputum samples of chronic bronchitis patients receiving TMP (Platt et al., 1983). Despite this observation, little is known about thymidine-dependent antibiotic resistance and its underlying consequences for NTHi pathogenesis. Following this notion, we observed that among 2,542 NTHi strains isolated between 2010 and 2014 from clinical samples at Bellvitge University Hospital (Spain), 119 strains formed slow-growing colonies on Mueller Hinton Fastidious (MH-F) agar, a thymidine low concentration medium. This observation prompted us to hypothesize that such slow-growth could relate to thymidine auxotrophy, rendering TxS resistance due to the antibiotic administration. If so, such auxotrophy could also modify the dynamics of the NTHi-host interplay. To address these hypotheses, we screened the available NTHi isolates with a slow growth on MH-F agar and identified one thymidine auxotroph, easily reversible to the normal phenotype. Moreover, to question the relationship between thymidine auxotrophy and respiratory infection by NTHi, we employed two genome sequenced strains, NTHi strain 375, hereafter NTHi375, and *H. influenzae* (Hi) RdKW20 (Fleischmann et al., 1995; Mell et al., 2014), to generate thymidine auxotrophs by mutating the *thyA* gene, and systematically evaluated its effect on (i) bacterial resistance to TxS, morphology, growth, self-aggregation, and gene expression; (ii) NTHi-host interplay by assessing bacterial binding to a panel of components of the complement system, adhesion to- and invasion of cultured airway epithelia; (iii) NTHi respiratory infection *in vivo* by using a murine intranasal infection model upon TxS treatment. This work provides further evidence of the emergence of NTHi TxS resistance upon its administration, and shows for the first time

that mutation of the thymidylate synthase encoding gene *thyA* in NTHi leads to a strong impact on its physiology and virulence, but also provides a survival advantage during TxS challenge. Our results provide a context for a better understanding of the potential effects of TxS treatment against NTHi respiratory infection.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions

Strains used in this study are described in **Table 1**. NTHi strains were grown at 37°C, 5% CO₂ on chocolate agar (Biomérieux), MH-F agar (Biomérieux), or brain-heart infusion (BHI) agar supplemented with 10 µg/ml hemin and 10 µg/ml nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), referred to as sBHI. NTHi liquid cultures were grown in sBHI (37°C, 5% CO₂). Thymidine (Sigma-Aldrich) was dissolved in sterile distilled water (stock solution, 10 mg/ml). When necessary, media were supplemented with thymidine by (i) using sterile paper discs soaked on thymidine 300 µg/ml or 10 mg/ml, (ii) thymidine 300 µg/ml spreading on 20 ml chocolate agar or MH-F agar plates, (iii) thymidine 300 µg/ml addition into sBHI. Erythromycin 11 µg/ml (Erm₁₁) or spectinomycin 50 µg/ml (Spec₅₀) were used when required. *Escherichia coli* was grown on Luria Bertani (LB) agar at 37°C, supplemented with ampicillin 100 µg/ml (Amp₁₀₀), erythromycin 150 µg/ml (Erm₁₅₀) or Spec₅₀, when necessary.

For *thyA* disruption, a DNA fragment containing the *thyA* gene and its respective adjacent regions (2,852 bp), was PCR amplified with *Phusion* polymerase (ThermoFisher) using

NTHi375 genomic DNA as template and primers thyA-F1 (5'-TGCTGAATATTCGCTCGGTTACATTTA) and thyA-R1 (5'-CGATGATACTTAAAAGTAATCGCGACCAAAAATTCGG). The gene-containing fragment was cloned into pJET1.2 (ThermoFisher), generating pJET1.2-*thyA*. This cloned PCR product was disrupted by inverse PCR with *Phusion* polymerase, using primers thyA-F2 (5'-CGTTCCTGTGATGTTCCGCTTGGA) and thyA-R2 (5'-ATATCATCAACGCCTCTACGATGC). An internal 226-bp fragment (nucleotides 312–537 in the *thyA* coding sequence) was replaced by a blunt-ended erythromycin resistance cassette excised by *Sma*I digestion from pBSLerm (Allen et al., 2005), generating pJET1.2-*thyA::ermC*. This plasmid was used as a template to amplify the *thyA::ermC* disruption cassette with primers thyA-F1 and thyA-R1, which was used to transform NTHi375 using the MIV method (Herriott et al., 1970). Transformants were screened by plating bacteria on sBHI agar with Erm₁₁ to obtain NTHi375Δ*thyA*. Same approach and disruption cassette were used to generate RdKW20Δ*thyA*. For mutant confirmation, NTHi375Δ*thyA* and RdKW20Δ*thyA* genomic DNA were used as template to be PCR amplified with four primer pairs: (i) thyA-F1 and thyA-R1, rendering a 3,814 bp product; (ii) thyA-F1 and pBSLerm-down (5'-GGTACACGAAAAACAAGTTAAGGG), rendering a 2,421 bp product; (iii) pBSLerm-up (5'-ATAAAGAGGGTTATAATGAACGAG) and thyA-R1, rendering a 2,190 bp product; (iv) pBSLerm-up and pBSLerm-down, rendering a 797 bp product (data not shown). Recombination events resulting from integration of the *thyA* disruption

TABLE 1 | Strains and plasmids used in this study.

	Description	Source
STRAINS		
<i>Haemophilus influenzae</i>		
NTHi375	Wild-type, otitis media clinical isolate	Hood et al., 1999
NTHi375Δ <i>thyA</i>	<i>thyA::ermC</i> , Erm ^R	This study
NTHi375Δ <i>nupC</i>	<i>nupC::spec</i> , Spec ^R	This study
RdKW20	Laboratory strain, capsule-deficient serotype d	Fleischmann et al., 1995
RdKW20Δ <i>thyA</i>	<i>thyA::ermC</i> , Erm ^R	This study
RdKW20Δ <i>nupC</i>	<i>nupC::spec</i> , Spec ^R	This study
NTHi8233	COPD isolate from a sputum sample, thymidine auxotroph	This study
<i>Escherichia coli</i>		
TOP 10	Used for cloning assays	ThermoFisher scientific
SW102	Derived from DY380, it contains a defective λ prophage with the recombination proteins <i>exo</i> , <i>bet</i> , and <i>gam</i> being controlled by the temperature-sensitive repressor <i>cI857</i>	Tracy et al., 2008
PLASMIDS		
pJET1.2	Cloning vector	ThermoFisher scientific
pBSLerm	Source of an Erm ^R cassette	Allen et al., 2005
pJET1.2- <i>thyA</i>	pJET1.2 with a 2,852 bp insert containing the <i>thyA</i> _{NTHi375} gene (852 bp) and 1 kb flanking regions	This study
pJET1.2- <i>thyA::ermC</i>	pJET1.2 with a 3,814 bp insert containing a <i>thyA</i> _{NTHi375} :: <i>ermC</i> disruption cassette	This study
pJET1.2- <i>nupC</i>	pJET1.2 with a 2,664 bp insert containing the <i>nupC</i> _{RdKW20} gene (1,254 bp) gene and ~700 bp flanking regions	This study
pJET1.2- <i>nupC::spec</i>	pJET1.2 with a 3,501 bp insert containing a <i>nupC</i> _{RdKW20} :: <i>spec</i> disruption cassette	This study
pRSM2832	pKD13 derivative carrying a cassette containing a spectinomycin resistance gene flanked by FRT sites	Tracy et al., 2008

cassette in the NTHi375 and RdKW20 genomes were further verified by NTHi375 Δ *thyA* and RdKW20 Δ *thyA* genomic DNA PCR amplification with primers *thyA*-F1 and *thyA*-R1, and PCR product sequencing with primers *thyA*-F1, pBSLerm-up, pBSLerm-down and *thyA*-R1. When necessary, the *thyA* gene was PCR amplified with primers *ThyA_Pro_F* (5'-TGCGCCTTTGATTCCGTTT) and *ThyA_R2* (5'-TCACCTAACGCTTCCGCTTT) for DNA sequencing.

The *nupC* gene and its respective adjacent regions (2,664 bp) was amplified by PCR with *Phusion* polymerase using RdKW20 genomic DNA as template and primers *nupC*-F1 (5'-ATGAACAGGTTATGGAGGCAGTTCCAT) and *nupC*-R1 (5'-GTGAGTACGAATATGGTCAGACACGGT). The gene-containing fragment was cloned into pJET1.2, generating pJET1.2-*nupC*. A *Spec^r* cassette was PCR amplified from pRSM2832 using gene-specific mutagenic primers *nupC*-F2 (5'-GTAGAATAAGCCGAATTTTATTAACCTAACTAACTAACTAGGGGAATCAAATGATTCCGGGGATCCGTCGACC) and *nupC*-R2 (5'-TACCGCACTTTTAAATTGATTAAGATAAATTAAGTGCTGCAGCACCTAAGCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG), as described previously (Tracy et al., 2008). Primers were designed to delete sequences between the start codon and the last seven codons of *nupC*. *E. coli* SW102 cells were prepared for recombineering, co-electroporated with pJET1.2-*nupC* (Amp^r; 50 ng) and the *nupC*-specific mutagenic cassette (*Spec^r*; 200 ng) as previously described (Sinha et al., 2012), and mutagenized clones containing pJET1.2-*nupC*::*spec* were selected on LB agar with Amp₁₀₀, *Spec*₅₀. This plasmid was used as a template to amplify the *nupC*::*spec* disruption cassette with primers *nupC*-F1 and *nupC*-R1, which was used to transform NTHi375 and RdKW20 using the MIV method. Transformants were selected on sBHI agar with *Spec*₅₀, to obtain NTHi375 Δ *nupC* and RdKW20 Δ *nupC* mutant strains.

Screening for NTHi Thymidine Auxotroph Clinical Isolates

Laboratory records of Microbiology Department at the Bellvitge University Hospital (Spain) regarding the difficulties of some NTHi isolates to growth on conventional antimicrobial susceptibility testing medium (Mueller-Hinton agar+5% defibrinated horse blood and 20 mg/l β -NAD, MH-F) were reviewed from 2010 to 2014. Screening for thymidine auxotrophs among NTHi clinical isolates was based on the interpretation of their growth characteristics. Isolates identified as having growth problems were further screened for thymidine auxotrophy by comparative growth on chocolate agar plates and low-thymidine MH-F agar plates. Thymidine auxotrophy was confirmed by testing strain growth on MH-F agar in the absence or presence of discs soaked with thymidine.

Susceptibility Testing under Non-standard Conditions

TxS susceptibility testing of NTHi thymidine auxotrophs failed to produce results by disc diffusion (Becton Dickinson), *E*-test (Biomérieux) or broth microdilution when inoculated on MH-F

and incubated for 24 h, as specified by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; http://www.eucast.org/clinical_breakpoints). Given that chocolate agar supported growth for all strains after 24 h of incubation, this medium was used for *E*-test- or TxS discs-based determination of minimal inhibitory concentrations (MIC). Strains were grown on chocolate agar, to generate bacterial suspensions normalized in phosphate-buffered saline (PBS) to OD₆₀₀ = 1. Normalized suspensions were spread on chocolate agar or, when necessary, on MH-F agar, in the presence of *E*-test or TxS discs (23.75 mg/1.25 mg SMX:TMP) and incubated for 24 h before assessing the diameter of the growth inhibition zones.

Growth Curves

To monitor growth, NTHi strains grown on chocolate agar for 16 h were inoculated (2–5 colonies) in 20 ml sBHI, with or without thymidine, and incubated for 11 h with shaking. Cultures were diluted in 40 ml sBHI, with or without thymidine, to OD₆₀₀ = 0.01 (RdKW20) or OD₆₀₀ = 0.05 (NTHi375), incubated with agitation, and OD₆₀₀ was recorded every hour for 8 h. Every 2 h, culture samples were serially diluted and plated on sBHI agar. Data are shown both as OD₆₀₀ and c.f.u./ml. At the final time point, 10 μ l of the bacterial cultures were placed on glass coverslips and fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA) in PBS pH 7.4 for 15 min at room temperature. Bacteria were labeled with a polyclonal rabbit anti-NTHi primary antibody diluted 1:600 and a donkey anti-rabbit conjugated to Cy2 (Jackson Immunological) secondary antibody diluted 1:100. Samples were analyzed with a Carl Zeiss Axioskop 2 plus fluorescence microscope and a Carl Zeiss Axio Cam MRm monochrome camera.

Confocal Microscopy

NTHi strains were grown on chocolate agar for 16 h, in the absence or presence of thymidine, and a colony was aseptically spread with an inoculation loop over a drop of distilled water on a microscopy slide. Samples were air-dried and stained for 15 min in the darkness with the cell-permeable fluorescent nucleic acid stain SYTO 9 (Life Technologies), following the manufacturer's instructions. Samples were washed twice with distilled water and fluorescence was observed by confocal laser microscopy. Images were acquired using a Leica TCS-SL filter-free spectral confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems) equipped with a 488 nm argon laser, 543 nm and 633 nm He/Ne lasers (Centres Científics i Tecnològics-Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Spain) using a 63 \times magnification oil immersion objective (1.4 numerical aperture), and an image resolution of 1024 \times 1024 pixels. Images were acquired randomly and analyzed using the Leica Confocal Software 2.5 (Leica Microsystems).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

H. influenzae strains were examined by TEM after growth on chocolate agar following established procedures (Remuzgo-Martínez et al., 2015). Briefly, bacteria were applied to Formvar-coated grids, air dried, negatively stained with 1% phosphotungstic acid in distilled water for 10 s, and examined with a JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL)

operating at 80 kV and equipped with an Orius SC1000 charge-coupled device (CCD) camera (Gatan).

RNA Extraction and Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR) Analysis

NTHi strains were grown for 16 h on chocolate agar. Bacteria (2–5 colonies) were inoculated into 20 ml sBHI, grown for 11 h, with or without thymidine, diluted into 40 ml fresh sBHI to $OD_{600} = 0.05$, in the absence or presence of thymidine, and grown to $OD_{600} = 0.6$. Bacterial total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). Total RNA quality was evaluated using RNA 6000 Nano LabChips (Agilent 2100 Bioanalyzer). All samples had intact 16S and 23S ribosomal RNA. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA (1 μ g) using SuperScript II Reverse Transcriptase reagents (Invitrogen). Real-time quantitative PCR was performed using Thermo Scientific Luminaris HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Scientific) and fluorescence data were analyzed with BioRad CFX96 qPCR System (Bio-Rad). Relative quantities of mRNAs were calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method and normalized using 16S ribosomal RNA (*16SrRNA*) as an endogenous control. Primer pairs were designed with Primer3 software: for *nupC*, *nupC*-RT-Fw (5'-ATGTTAATCGCATTCGTTGGTT) and *nupC*-RT-Rv (5'-ATTTGTCCTGCAATACCTGCTT); for *tdk*, *tdk*-RT-Fw (5'-TGTGCTTTGTTATGGCTTGC) and *tdk*-RT-Rv (5'-CTTTAATGACCTCGCCCTGA); for *16SrRNA*, *16S*-Fw (5'-GGCGTTGATGACCGTGAAAC) and *16S*-Rv (5'-GCCAGTAATAATCGCCCTCTCTAG). Data are expressed as relative expression on mutant strains compared to their parental wild-type strains, considered to be 1. All measures were carried out in duplicate and at least three times ($n \geq 6$).

Bacterial Aggregation Assay

Three to four colonies of NTHi grown on chocolate agar for 16 h were inoculated into 20 ml sBHI, grown for 11 h, diluted in sBHI to $OD_{600} = 1$ and left standing at room temperature for 5 h (starting volume ~ 25 ml). The viability of each culture was tested by serial dilution and plating on sBHI agar at the beginning of each experiment ($t = 0$; data not shown). OD_{600} readings were performed at regular time intervals on 700 μ l aliquots collected from the top of each bacterial suspension. At least four independent experiments ($n \geq 4$) were performed for each strain.

Phosphorylcholine (PCho) Quantification

Three to four colonies of NTHi grown on chocolate agar for 16 h were inoculated into 20 ml sBHI, grown for 11 h, diluted into 40 ml sBHI to $OD_{600} = 0.05$, grown to $OD_{600} = 0.6$ in the absence or presence of thymidine, serially diluted, plated on sBHI agar for c.f.u. determination, and used to generate stocks stored at -80°C in sBHI with 20% glycerol as single use aliquots for further experiments. For PCho determination, $\sim 1 \times 10^7$ c.f.u. were incubated for 1 h at 37°C with TEPC-15, a mouse monoclonal antibody specific for PCho (Sigma-Aldrich) diluted 1:25 in PBS-0.05% Tween 20. Samples were washed twice with PBS-0.05% Tween 20, and incubated with a fluorescein

isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti-mouse (Serotec) diluted 1:300 in PBS-0.05% Tween 20 for 30 min at 4°C under dark conditions. Bacteria were washed with PBS-0.05% Tween 20, fixed in 3% paraformaldehyde (PFA) for 2–3 min at room temperature, and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) using forward and side scatter parameters to gate on at least 25,000 bacteria. Results are expressed as a relative percent fluorescence index (RFI), to measure both the proportion of fluorescent bacteria positive for PCho and the intensity of fluorescence (Ramos-Sevillano et al., 2015). Assays were performed in quadruplicate in at least three independent occasions ($n \geq 12$).

Binding of Complement Factors to NTHi

Bacterial strains were grown as indicated for PCho determination. C3b deposition was analyzed as explained previously (Ramos-Sevillano et al., 2015). Briefly, a bacterial suspension containing $\sim 1 \times 10^7$ c.f.u. was opsonized with human serum diluted 1:4 in PBS-0.05% Tween 20, and detected with a FITC-conjugated polyclonal goat anti-human C3b antibody (ICN-Cappel) diluted 1:300 in PBS-0.05% Tween 20 for 30 min at 4°C under dark conditions. CRP binding was measured as previously described (Ramos-Sevillano et al., 2015), by incubating $\sim 1 \times 10^7$ c.f.u. with human serum diluted 1:4 in PBS-0.05% Tween 20 and detected with a polyclonal rabbit anti-human CRP antibody (Calbiochem) for 1 h at 37°C , followed by two washes with PBS-0.05% Tween 20. Bacterial suspensions were then incubated for 30 min with a FITC-conjugated polyclonal goat anti-rabbit antibody in PBS-0.05% Tween 20 for 1 h at 37°C . For both C3b and CRP binding, bacteria were finally washed with PBS-0.05% Tween 20, fixed in 3% PFA, and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer as described above. Results are expressed as a RFI. Assays were performed in quadruplicate in at least three independent occasions ($n \geq 12$).

Cell Culture and Bacterial Infection

A549 human alveolar basal epithelial cells (ATCC CCL-185) were maintained as described (Morey et al., 2011), seeded to 6×10^4 cells/well for 32 h, and serum-starved 16 h before infection. NCI H-292 mucoepidermoid pulmonary human carcinoma epithelial cells (ATCC CRL-1848) were maintained as described (Euba et al., 2015c), and seeded to 4×10^5 cells/well 16 h before infection. Adhesion and invasion assays were performed and processed as described (Morey et al., 2011; Lopez-Gomez et al., 2012; Euba et al., 2015a,c). For infection, PBS-normalized bacterial suspensions ($OD_{600} = 1$) were prepared by using NTHi strains grown on chocolate agar for 16 h, or in 20 ml sBHI for 11 h in the absence or presence of thymidine. A multiplicity of infection (MOI) of $\sim 100:1$ was used. To monitor adhesion, cells were infected for 30 min. Although this assay does not completely exclude a possible internalization of some bacteria, experimental conditions were previously set to mainly monitor adhesion (Morey et al., 2011; data not shown). For invasion assays, cells were incubated with bacteria for 2 h, washed three times with PBS, incubated for 1 h with RPMI 1640 medium containing 10% FCS, Hepes 10 mM, and gentamicin 200 μ g/ml to kill extracellular bacteria.

When necessary, A549 cells were infected for 30 min with bacterial suspensions ($OD_{600} = 1$) generated with bacteria grown on chocolate agar, in the absence or presence of thymidine; infections were performed in RPMI 1640, and in the absence or presence of purified C3 (16 $\mu\text{g/ml}$), 2% C3-deficient human serum (HS), or C3-depleted HS reconstituted with purified C3. Human C3-deficient serum and human complement C3 were purchased from Sigma-Aldrich. Cells were then washed three times with PBS, lysed with 300 μl of PBS-saponin 0.025% for 10 min at room temperature, and serial dilutions were plated on sBHI agar. All infections were performed in triplicate at least three independent times ($n \geq 9$). Results are expressed as c.f.u./ml.

Secretion of IL-8

For A549 cell stimulation by NTHi, bacteria grown on chocolate agar, in the absence or presence of thymidine, were collected with PBS, suspensions were normalized to $OD_{600} = 1$, and used for a 2 h infection with a MOI of $\sim 100:1$. Cells were washed three times with PBS, and incubated for 6 h in RPMI 1640 medium containing 10% FCS, Hepes 10 mM and gentamicin 100 $\mu\text{g/ml}$. Supernatants were collected from the wells, cell debris removed by centrifugation and samples frozen at -80°C . IL-8 levels in the supernatants were measured by ELISA (Abnova KA0115) with sensitivity < 2 pg/ml. Infections were performed in duplicate and at least twice ($n \geq 4$). Results are expressed as IL-8 pg/ml.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

A549 cells were seeded on glass coverslips and infected as described above, by using bacteria previously grown on chocolate agar. Coverslips were fixed in ice-cold 3% glutaraldehyde for 20 min at 4°C . Samples were dehydrated in a series of graded acetone, dried by the critical point method, coated with gold in a Fine coat ion sputter JFC-1100 226 (JEOL, Ltd) and observed with an Inspect S microscope (FEI Company) working at 15 or 20 kV (Lazaro-Diez et al., 2016).

NTHi Mouse Lung Infection

A CD1 mouse model of NTHi lung infection was used, as described previously (Morey et al., 2013; Euba et al., 2015a,b,c). CD1 female mice (18–20 g) aged 4–5 weeks were purchased from Charles River Laboratories (France), housed under pathogen-free conditions at the Institute of Agrobiotechnology facilities (registration number ES/31-2016-000002-CR-SU-US), and used at 22–25 g. Animal handling and procedures were in accordance with the current European (Directive 86/609/EEC) and National (Real Decreto 53/2013) legislations, following the FELASA and ARRIVE guidelines, and with the approval of the Universidad Pública de Navarra (UPNa) Animal Experimentation Committee (Comité de Ética, Experimentación Animal y Bioseguridad) and the local Government authorization. NTHi375 and NTHi375 Δ thyA were used for lung infection, and mice were randomly divided into two groups ($n = 5$): (i) control, vehicle solution (0.1 ml PBS) administered by oroesophageal gavage (Popper & Sons Inc.); (ii) one dose of TxS each 6 h administered by oroesophageal gavage, starting at 6 h post-infection (hpi). TxS (Septrin, 8 mg/40 mg/ml TMP:SMX)

treatment was performed at a dose of 960 mg/kg of body weight in 0.1 ml PBS. Infecting bacteria were previously grown on chocolate agar, in the absence or presence of thymidine. For NTHi intranasal infection, 40 μl of a NTHi suspension containing $\sim 5 \times 10^8$ c.f.u./ml ($\sim 2 \times 10^7$ c.f.u./mouse) were placed at the entrance of the nostrils until complete inhalation, in mice previously anesthetized with ketamine-xylazine (3:1). At 12, 24, or 48 hpi, mice were euthanized using cervical dislocation. BALF samples were obtained by perfusion and collection of 0.7 ml of PBS, with help of a sterile 20G (1.1 mm diameter) Vialon™ intravenous catheter (Becton-Dickinson) inserted into the trachea. An aliquot of each recovered BALF was serially 10-fold diluted in PBS, and plated on sBHI agar to determine the number of viable bacteria. Results are expressed as mean \pm SD of individual \log_{10} c.f.u./BALF. In parallel, lungs were removed; the left one was processed for viable bacterial counts (as detailed above), and the right lung was fixed in 10% neutral buffered formalin for histological purposes. Heads and necks containing upper airways, larynx, and tracheas were fixed in the same buffered formalin for histology. Uninfected mice receiving PBS or TxS were used as controls when necessary.

For cell counting, the remaining volume of each BALF sample was centrifuged at 5,000 r.p.m. for 3 min at 4°C . Each pellet was resuspended in 1 ml RPMI 1640 with 10% FCS and Hepes 10 mM, and total cell count determined using a hemocytometer. $\sim 5 \times 10^4$ cells in 200 μl RPMI 1640 with 10% FCS and Hepes 10 mM were used for cytospin preparation (1,500 r.p.m. for 10 min at room temperature, Thermo Shandon Cytospin). Giemsa stains were performed with an automated hematology slide preparation unit (SP-10, Sysmex Cosporation) according to the manufacturer's instructions. Preparations were examined in a double-blinded manner with an optical microscope (BX, Olympus).

Histopathology and Lesion Score

Heads and necks were rinsed in running tap water for 1 h, immersed in 5% nitric acid for 24–36 h until complete decalcification, and 7–8 transaxial slices were made every 3–4 mm beginning at the nostrils and finishing in the caudal tracheas. Transaxial slices and lungs were embedded in paraffin, and 4–6 μm sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) by standard procedures, and examined by microscopy to determine the presence and extent of inflammatory lesions. Sections were examined blind as sets by a trained veterinary pathologist (Dr. M. Barberán). Parameters characterizing an acute inflammatory reaction in upper airways, larynx, trachea, and lung, including hemorrhages, hyperemia, polymorphonuclear cell infiltrates (PMNs), and alveolar macrophages, were subjectively scored on a scale of 0–3 (0: absent, 1: mild, 2: moderate, 3: severe). For tissue control, similar organs obtained from non-infected control and TxS treated mice were processed in an identical manner to the infected tissues.

Statistical Analysis

For self-aggregation, gene expression, diameter of growth or inhibition zones, PCho level, complement deposition, cell

infection, bacterial loads in lungs and BALF samples, and inflammatory cells in BALF samples, mean \pm SD were calculated and statistical comparison of means performed using the two-tail *t*-test. For histopathology scoring, means \pm SD were also calculated and statistical comparisons performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's protected least significant difference (PLSD) multiple-comparison test. In all cases, a *p* < 0.05 value was considered statistically significant. Analyses were performed using Prism software, version 6 for Mac (GraphPad Software) statistical package.

RESULTS

Isolation of a Thymidine Dependent NTHi Strain from the Sputum of a COPD Patient Receiving TxS

Among 2,542 clinical NTHi isolated between 2010 and 2014 at Bellvitge University Hospital (Spain), 119 (4.7%) isolates formed slow-growing colonies on MH-F agar. Thymidine auxotrophy was screened on the 119 isolates by comparative growth on chocolate agar and on low-thymidine MH-F agar. Thymidine auxotrophy was confirmed by absence of bacterial growth on MH-F agar, and further growth on MH-F agar in the presence of discs soaked in thymidine. One thymidine auxotroph NTHi isolate, named strain 8233, was identified in a sputum sample recovered from a COPD patient who had received TxS for 36 days to treat an acute exacerbation by *Stenotrophomonas maltophilia*. NTHi8233 produced small colonies on chocolate agar (data not shown) and did not grow on MH-F agar, except when discs soaked with thymidine 300 μ g/ml or 10 mg/ml were added to the plate. Bacterial growth showed to be dependent on thymidine concentration (**Figure 1A**). The thymidylate synthase encoding gene *thyA*_{NTHi8233} was sequenced, and a 6 nt duplication 267GAAAAT rendering a two-amino acid insertion (E90N91) was found, when compared to that of the RdKW20 genome sequenced reference strain (Fleischmann et al., 1995). A prediction of ThyA_{H.influenzae} tertiary structure, based on *Burkholderia thailandensis* ThyA protein (PDB: 3V8H), was generated by the automated modeling tool of the Swiss Model web service (<http://swissmodel.expasy.org>). ThyA_{NTHi8233} displayed 11 α -helices, 6 β -sheet strands and several coil connecting segments (Figure S1A). Homology between ThyA_{NTHi8233} and ThyA_{RdKW20} predicted structures is shown by structural alignment (Figure S1D).

NTHi8233 morphology was analyzed by confocal microscopy, and showed non-septated bacterial filaments \sim 5–10 times longer than the average NTHi bacteria (**Figure 1A**, right). The absence of NTHi8233 growth on MH-F agar did not allow assessing its antibiotic susceptibility following standard procedures (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints), and TxS resistance was tested by *E*-test on bacteria grown on chocolate agar. The MIC of TxS for NTHi8233 was >32 μ g/ml. NTHi8233 thymidine auxotrophy was found to be easily reversible, as described for other pathogens (Kahl, 2014). Thymidine prototroph reverted NTHi8233 strain did not present a filamented morphology (data not shown) and the sequence of the *thyA* gene did not present

the 6 nt duplication described above, even though its MIC of TxS remained unchanged.

Identification of NTHi8233 supports the notion that thymidine auxotrophy may be a bacterial response to TxS treatment that could be underestimated due to the lack of growth on MH-F agar and given that, as previously stated for other NTHi isolates (Platt et al., 1983), was shown to be reversible. This observation prompted us to generate mutant strains lacking the *thyA* gene on previously characterized NTHi genetic backgrounds for a detailed study of the impact of thymidine auxotrophy for this pathogen.

Generation and Characterization of Thymidine Dependent *H. influenzae* strains

H. influenzae genome sequenced strains NTHi375 and RdKW20 were employed to generate thymidine dependent mutants by disruption of the *thyA* gene (*thyA* accession numbers NF38_0045 and HI0905, respectively). At the protein level, ThyA_{NTHi375} and ThyA_{RdKW20} displayed 98.2% identity (Figure S1E). NTHi mutants lacking the *thyA* gene were selected on sBHI agar and rendered normal size colonies (data not shown), did not grow on MH-F agar, and grew around discs soaked with thymidine on MH-F agar. Growth was dependent on the thymidine concentration present on the discs (**Figure 1B** and **Table 2**). Thus, the *thyA* mutants displayed a larger growth zone around discs soaked with thymidine 10 mg/ml than around discs soaked with thymidine 300 μ g/ml (NTHi375 Δ *thyA*, *p* < 0.005; RdKW20 Δ *thyA*, *p* < 0.05). In contrast, wild-type (WT) bacteria presented a normal growth on MH-F agar. For NTHi375 WT and Δ *thyA* strains, the MICs of TxS were 0.25 and 0.38–0.5 μ g/ml, respectively. For RdKW20 WT and *thyA* mutant strains, the MICs of TxS were 0.12 and 0.5–0.75 μ g/ml, respectively. For purpose of illustration, larger growth inhibition zones were observed for WT than for *thyA* mutant strains on chocolate agar around TxS discs (**Figure 1B**). The morphology of NTHi375 Δ *thyA* and RdKW20 Δ *thyA* strains was assessed by confocal microscopy, showing non-septated filaments longer than their respective WT bacteria. Bacterial median length, measured by TEM in \sim 70 bacteria per strain, was (i) 1.42 \pm 0.56 and 3.78 \pm 2.86 μ m for NTHi375 WT and Δ *thyA* strains, respectively (*p* < 0.0001); (ii) 1.43 \pm 0.24 and 4.6 \pm 4.98 μ m for RdKW20 WT and Δ *thyA* strains, respectively (*p* < 0.0001). In agreement, SEM showed enlarged thymidine dependent bacteria on the surface of infected A549 human airway epithelial cells, which may modify the infectious process, compared to that shown by the WT strains (**Figure 1B**).

NTHi self-aggregates, which may promote microcolony formation on host cell surfaces (Meng et al., 2011; Mell et al., 2016). We asked whether the observed thymidine auxotrophy-driven increased bacterial size differs in its self-aggregation, by using tube-settling assays and monitoring the optical density of bacterial suspensions over time. Thymidine dependent mutants self-aggregated faster than their respective WT strains (**Figure 1C**).

Together, inactivation of the *thyA* gene in NTHi (i) impaired bacterial growth on MH-F agar, compensated by addition of

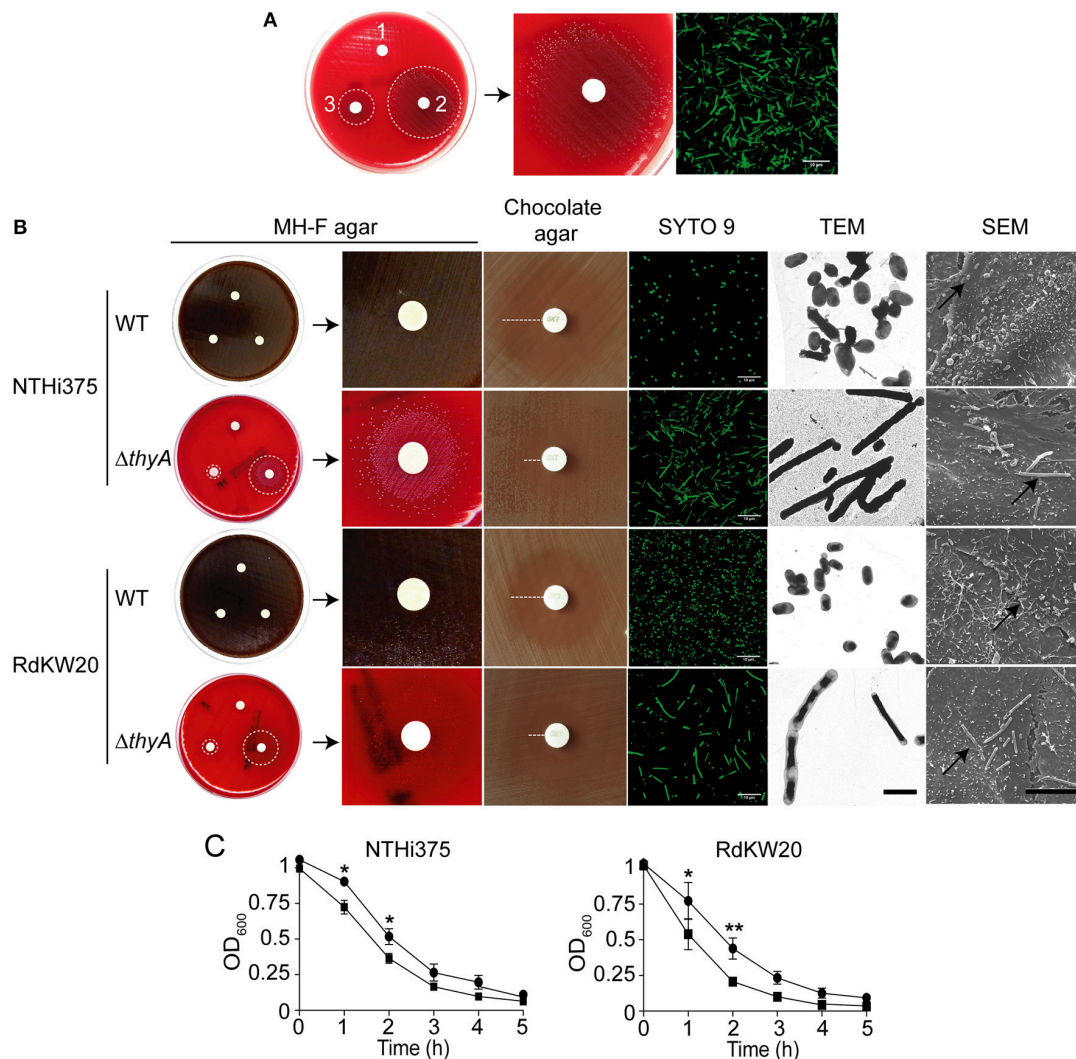


FIGURE 1 | Thymidine auxotrophy modifies *H. influenzae* growth and morphology. **(A)** Growth of clinical isolate NTHi8233 on MH-F agar with sterile discs soaked in water (1), thymidine 10 mg/ml, thymidine 300 µg/ml (3). Dotted circles indicate the growth zone around discs (left). A zoom of bacterial growth around a disc soaked in thymidine 10 mg/ml is shown (middle). NTHi8233 morphology observed by SYTO 9 staining and confocal microscopy (scale bar, 10 µm; right). **(B)** Growth of NTHi375 and RdKW20 WT and $\Delta thyA$ strains on MH-F agar with sterile discs soaked in water (1), thymidine 10 mg/ml (2), thymidine 300 µg/ml (3). Bacterial growth rendering a lawn switches color of the MH-F agar medium from red to brown. Dotted circles indicate the growth zone around thymidine discs; zooms of bacterial growth around a disc soaked in thymidine 10 mg/ml are shown. Growth inhibition of NTHi375 and RdKW20 WT and $\Delta thyA$ strains on chocolate agar around TxS discs; dotted lanes indicate growth inhibition. Bacterial morphology observed by SYTO 9 staining and confocal microscopy (scale bar, 10 µm), TEM (scale bar, 2 µm; magnification 25000 \times), and SEM (scale bar, 10 µm; magnification 6000 \times). In SEM panels, black arrows indicate infecting bacteria. **(C)** Effect of thymidine auxotrophy on *H. influenzae* self-aggregation. Tube-settling experiment of bacterial cultures previously grown for 11 h on sBHI, after incubation at room temperature for 5 h. Left, NTHi375 WT and $\Delta thyA$ strains; right, RdKW20 WT and $\Delta thyA$ strains; WT strains, black circle; $\Delta thyA$ mutants, black square. Bacterial aggregation was quantified by measuring the decrease of absorbance at OD₆₀₀. The *thyA* mutants self-aggregated faster than their isogenic WT strains (for NTHi375, $p < 0.05$ at 1 and 2 h; for RdKW20, $p < 0.05$ at 1 h, and $p < 0.0005$ at 2 h). All significant differences are indicated with *.

external thymidine, (ii) triggered enlarged bacilli which self-aggregate faster than their isogenic WT strains, (iii) increased resistance to TxS.

Thymidine Auxotrophy Causes Growth Defects in *H. influenzae*

Growth in sBHI was analyzed for WT and *thyA* mutant strains. NTHi375 $\Delta thyA$ had an extended lag phase and lower final OD₆₀₀

than the WT strain, which correlated with a reduced viability, measured as c.f.u./ml at the indicated time points (Figure 2A). Although not as pronounced, RdKW20 $\Delta thyA$ also had a slightly extended lag phase and lower numbers of viable bacteria than those of the WT strain (Figure 2B). In both *thyA* mutants, the observed growth defects were partially restored by sBHI supplementation with thymidine 300 µg/ml, independently of its addition in the pre-culture used for further dilution in sBHI and

TABLE 2 | Bacterial growth in different media and conditions.

<i>H. influenzae</i> strain	Chocolate agar	MH-F agar	Diameter of bacterial growth on MH-F agar around Thy ^a disc (cm)	
			Thy 300 µg/ml	Thy 10 mg/ml
NTHi375	Yes	Yes	Yes	Yes
NTHi375Δ <i>thyA</i>	Yes	No ^b	0.65 ± 0.05	1.83 ± 0.025
NTHi375Δ <i>thyA</i> +Thy ^c	Yes	No	1.25 ± 0.05	2.9 ± 0.1
RdKW20	Yes	Yes	Yes	Yes
RdKW20Δ <i>thyA</i>	Yes	No	0.9 ± 0.1	1.83 ± 0.08
RdKW20Δ <i>thyA</i> +Thy	Yes	No	1.4 ± 0.1	3.35 ± 0.05

^aThy, thymidine.

^bTotal absence of bacterial growth.

^cNTHi375Δ*thyA*+Thy, bacteria previously grown on chocolate+Thy were used to inoculate chocolate agar or MH-F agar plates.

OD₆₀₀ recording, or in the actual sBHI culture used for growth monitoring over time (Figures 2A,B). Immunofluorescence microscopy at the final time point of the growth curve showed non-septated long bacterial filaments for NTHi375Δ*thyA* grown in sBHI, but a mixture of non-septated filaments and bacteria with the average NTHi WT size for NTHi375Δ*thyA* pre-grown in sBHI supplemented with thymidine 300 µg/ml (Figure 2A, right). This could relate to the observed restoration of final OD₆₀₀ but not of final bacterial counts for NTHi375Δ*thyA* when pre-cultured in sBHI supplemented with thymidine.

The *thyA* mutants, previously grown on chocolate agar with thymidine (chocolate+Thy), grew on MH-F agar around discs in a thymidine dependent manner, displaying a larger growth zone around discs soaked with thymidine 10 mg/ml than with thymidine 300 µg/ml (NTHi375Δ*thyA*, $p < 0.005$; RdKW20Δ*thyA*, $p < 0.005$). Of note, *thyA* mutants previously grown on chocolate+Thy rendered a better growth on MH-F agar around discs soaked in thymidine than that of the same strains previously grown on chocolate agar (for thymidine 300 µg/ml, NTHi375Δ*thyA*, $p < 0.05$; for thymidine 10 mg/ml, NTHi375Δ*thyA*, $p < 0.05$, RdKW20Δ*thyA*, $p < 0.005$; Figures 1B, 2 bottom and Table 2). Similarly, external thymidine (chocolate+Thy) rendered *thyA* bacterial length and morphology similar to those shown by their respective isogenic WT strains (Figures 1B, 2 bottom).

Thymidine Auxotrophy Modifies the Expression of the Nucleoside Transporter Encoding *nupC* Gene in *H. influenzae*

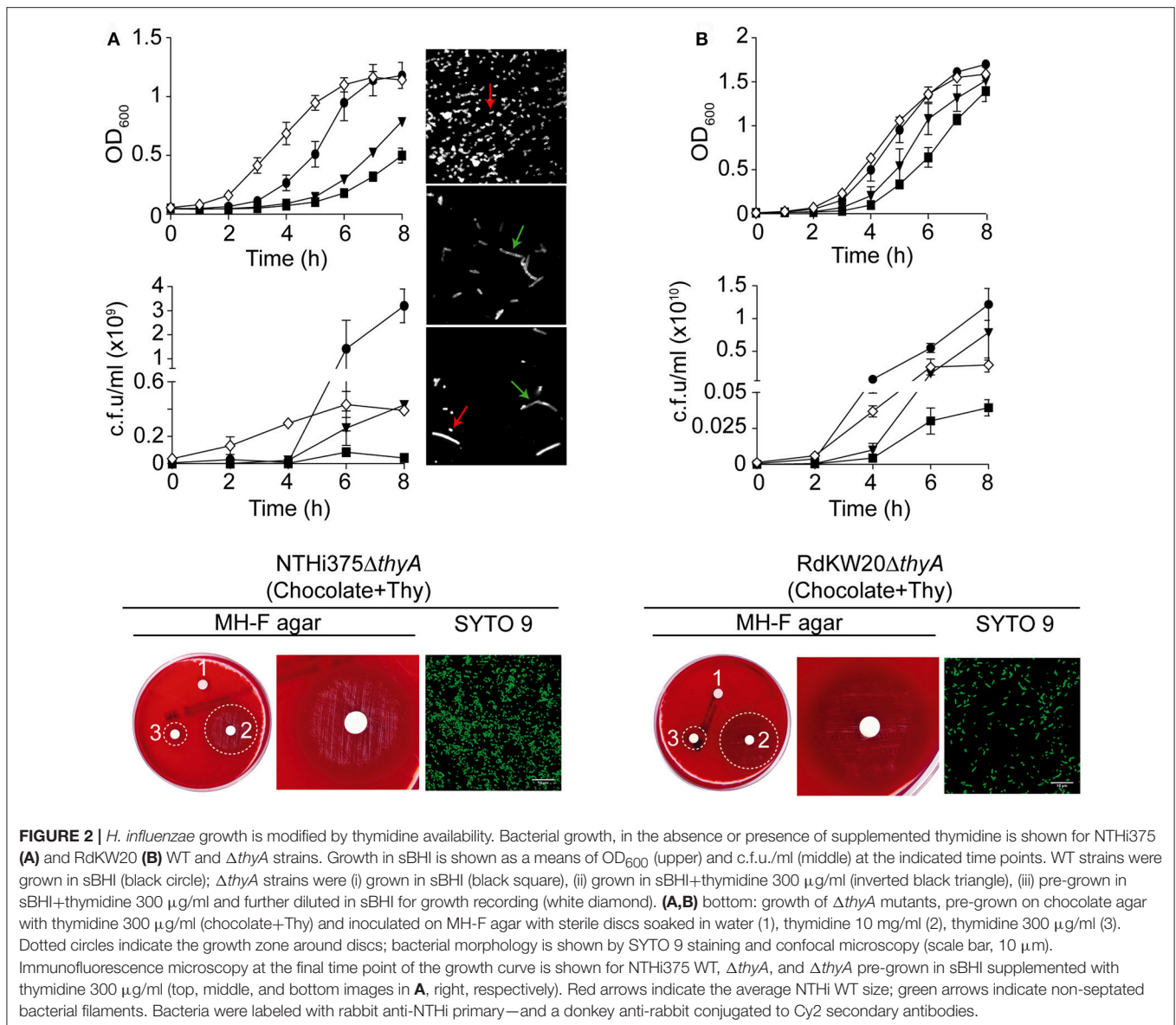
Both *thyA* mutants growth on MH-F agar around discs soaked in thymidine, and morphology/growth restoration in the presence of external thymidine, prompted us to speculate that these mutants may use external thymidine to overcome their nucleoside dependency. It has been previously shown that the nucleoside transporter encoding gene *nupC* is overexpressed in *S. aureus* thymidine dependent-SCVs, and that a Δ*nupC* mutant fails to use external thymidine for growth under TxS challenge (Chatterjee et al., 2008; Kriegeskorte et al., 2014). HI0519 and NF38_02480 are annotated as *nupC* in the RdKW20

and NTHi375 genomes, respectively (Fleischmann et al., 1995; Mell et al., 2014). Expression of the *nupC* gene in *H. influenzae* was assessed by RT-qPCR, showing a trend to be higher in the Δ*thyA* than in their isogenic WT strains grown in sBHI, with stronger evidence in NTHi375 (Figure S2A). As shown in Figure 2, sBHI supplementation with thymidine partially restored the growth defects shown by the *thyA* mutants. Following the notion that thymidine supplementation may restore mutant-related phenotypes, expression of the *nupC* gene was analyzed in Δ*thyA* bacteria when pre-cultured in sBHI with thymidine and then grown in sBHI, or when grown in sBHI supplemented with thymidine. Unexpectedly, when mutant bacteria were pre-cultured in sBHI supplemented with thymidine 300 µg/ml and then grown in sBHI, expression of the *nupC* gene was even higher than when pre-cultured and grown in sBHI (Figure S2A). Of note, a total absence of growth inhibition was observed for *thyA* mutant strains on chocolate agar around TxS discs, when pre-grown on chocolate+Thy (data not shown).

Next, NTHi375Δ*nupC* and RdKW20Δ*nupC* strains were generated, showing growth rates comparable to those of their respective WT strains in sBHI (Figure S2B), chocolate agar and MH-F agar (data not shown). To assess the biological function of *nupC* as a pyrimidine transporter responsible for the uptake of extracellular thymidine in *H. influenzae*, we tested the *nupC* mutants for their ability to use external thymidine for growth under TxS challenge in a TxS disc diffusion assay. Inhibition zones on chocolate agar and MH-F agar were comparable for WT and Δ*nupC* strains. Growth inhibition around TxS discs was also tested on chocolate agar and MH-F agar plates supplemented with thymidine. Unfortunately, no conclusive differences were observed because, as already described, bacterial growth on plates with high concentration of thymidine may produce haze or fine growth areas (Lorian, 1996). Following this notion, we performed a search for pyrimidine transporters in all available genome sequenced *H. influenzae* strains, which did not reveal the presence of nucleoside transporters additional to *nupC* in this bacterial species. We also unsuccessfully attempted to generate a NTHi double mutant strain lacking both the *thyA* and *nupC* genes (data not shown), further supporting a role for *nupC* in the uptake of external thymidine.

Moreover, thymidylate is synthesized either by the thymidylate synthase *ThyA* or by the thymidine kinase *TK*, and inactivation of the former has been shown to result in upregulated expression of the later one in *Mycoplasma pneumoniae* (Wang et al., 2010). HI0529 and NF38_02430 are annotated as a *tdk* thymidine kinase in the RdKW20 and NTHi375 genomes, respectively (Fleischmann et al., 1995; Mell et al., 2014). Different to *nupC*, the *tdk* gene expression was shown to be similar in WT and Δ*thyA* strains grown in sBHI, independently of thymidine addition (Figure S2C).

Together, these results suggest that *nupC* may be a transporter for external thymidine in *H. influenzae*, whose increased expression could contribute to bypass the effects of TxS upon *de novo* thymidylate biosynthesis.

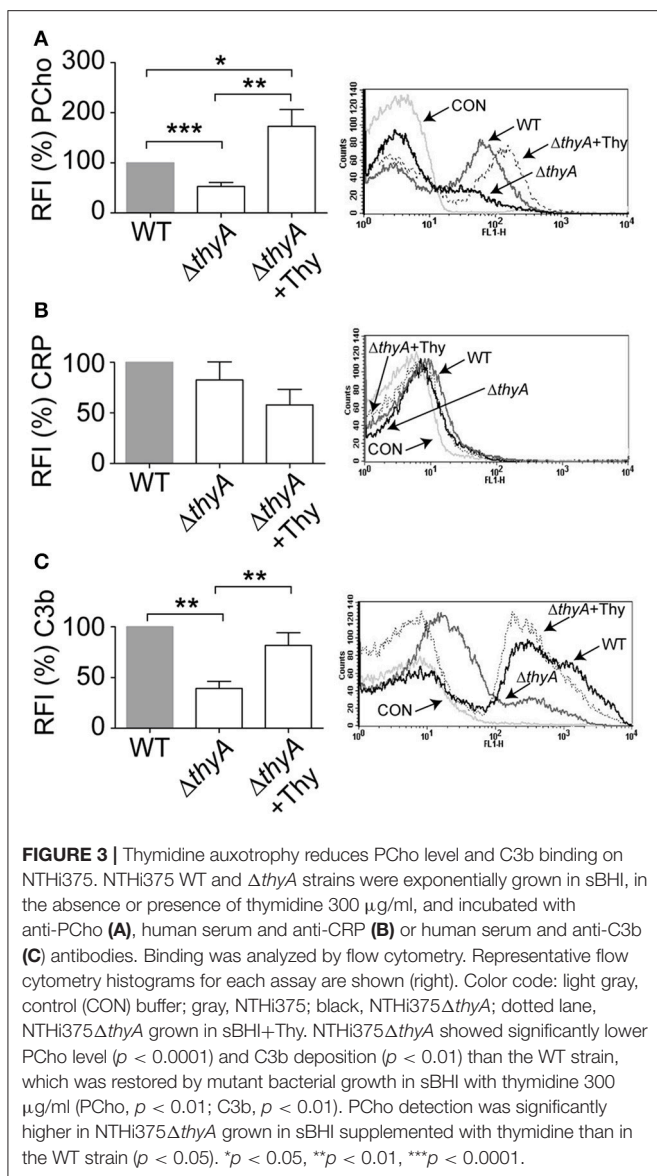


Thymidine Auxotrophy Reduces PCho Expression and C3b Deposition in *H. influenzae*

We have previously reported that bacteria lacking PCho self-aggregate slightly faster (Morey et al., 2013). Thymidine auxotroph mutants showed faster self-aggregation compared to that of their WT strains (Figure 1C), which could relate to changes in cellular morphology (i.e., elongation) or, alternatively, to a different amount of PCho residues on the bacterial surface. The level of PCho was measured on NTHi375 and RdKW20 WT and *thyA* mutant strains by flow cytometry using bacteria grown in sBHI. Thymidine auxotrophy was associated with a decreased detection of PCho in both NTHi375 $\Delta thyA$ and RdKW20 $\Delta thyA$ mutants, which was restored in NTHi375 $\Delta thyA$ by bacterial growth in sBHI in the presence of thymidine. Indeed, PCho detection was higher in the thymidine dependent mutants

grown in sBHI supplemented with thymidine than in their isogenic WT strains (Figure 3A and Figure S3A). Decreased levels of PCho in the *thyA* mutants may modify the bacterial ability to bind C-reactive protein (CRP; Weiser et al., 1998). However, CRP deposition on the bacterial surface was similar in WT and *thyA* mutant strains (Figure 3B and Figure S3B). Finally, to assess the possibility that cellular morphology may affect complement interaction, C3b deposition was analyzed. Thymidine auxotrophy was associated with decreased detection of C3b in NTHi375 $\Delta thyA$, which was restored by bacterial growth in sBHI supplemented with thymidine (Figure 3C). No differences were observed for C3b deposition between RdKW20 strains (Figure S3C).

Together, inactivation of the *thyA* gene caused a reduction in the amount of PCho residues on *H. influenzae* surface, leading to impaired C3b deposition in at least NTHi375, which suggests that



thymidine dependency may trigger changes affecting bacterial recognition by this key complement component by a CRP-independent mechanism.

Thymidine Auxotrophy Modifies *H. influenzae* Interaction with Human Airway Epithelia

The interplay of NTHi with the human respiratory epithelium plays a determinant role in the progression of infection (Clementi and Murphy, 2011). Next, we assessed if auxotrophy-related bacterial morphology changes could alter such interplay, by infecting A549 human type II pneumocytes with WT and *thyA* mutant strains (Morey et al., 2011; Lopez-Gomez et al., 2012; Euba et al., 2015c). Invasion by RdKW20 WT and *thyA* mutant strains was not assayed given the poor invasiveness of this

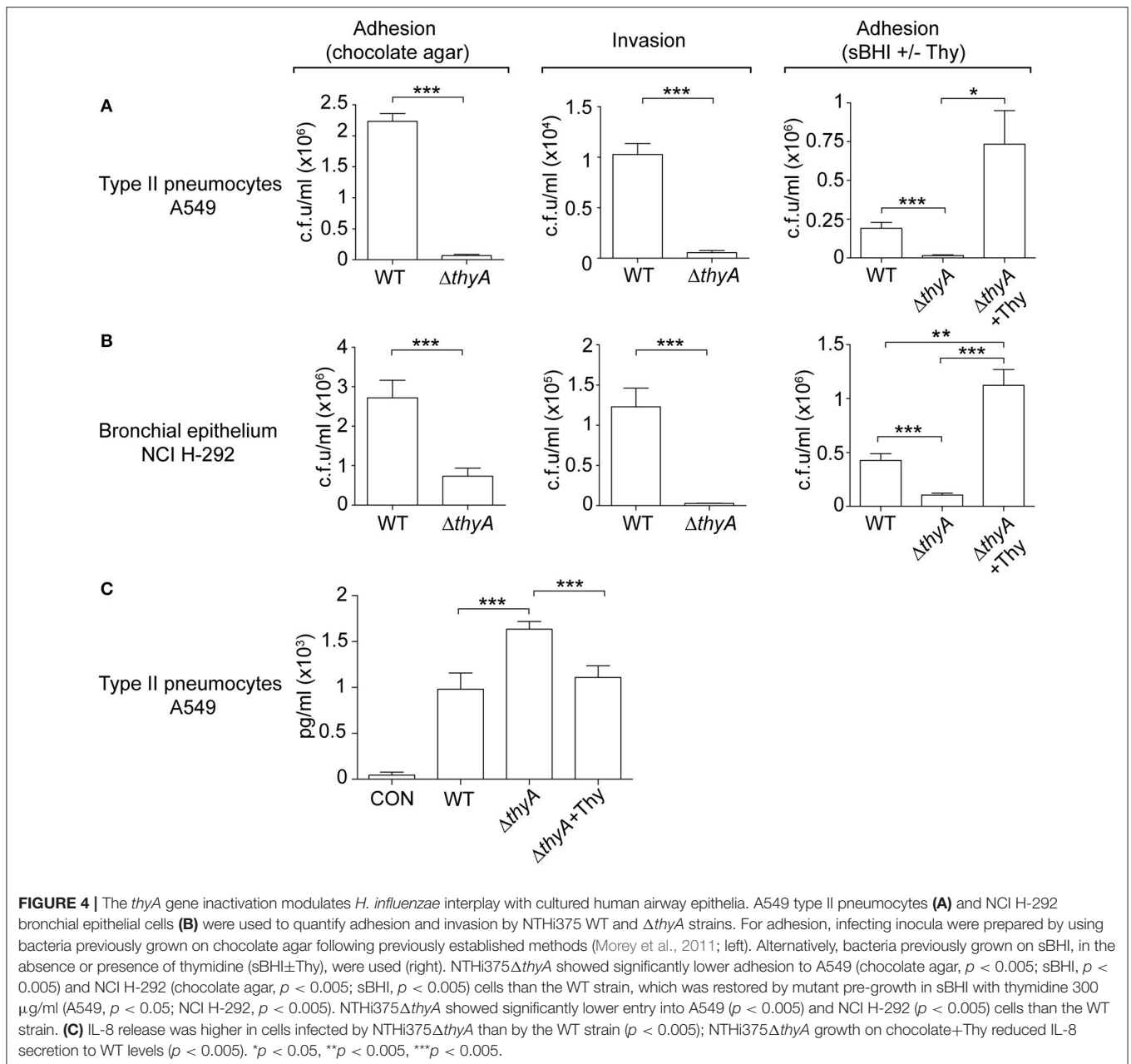
genetic background (Mell et al., 2016). A549 cell adhesion and invasion by NTHi375 $\Delta thyA$ was lower than that shown by the WT strain (Figure 4A). We also asked if external thymidine could restore such deficiency by using mutant bacteria grown in sBHI, in the absence or presence of thymidine (sBHI \pm Thy). A549 cell adhesion of NTHi375 $\Delta thyA$ grown in sBHI was lower than that shown by the WT strain, which was restored by thymidine addition (Figure 4A, right). Similar results were obtained for RdKW20 $\Delta thyA$ grown in sBHI, when compared to the WT strain, and to growth in sBHI with thymidine (Figure S4A). Given the impaired host cell interaction due to thymidine auxotrophy, we asked if inactivation of the *thyA* gene modifies the epithelial cell inflammatory response upon NTHi infection. Of note, the amount of secreted IL-8 was higher in A549 cells infected by NTHi375 $\Delta thyA$ than by the WT strain, and such increase was reduced to WT levels upon infection by NTHi375 $\Delta thyA$ previously grown on chocolate+Thy (Figure 4C). NTHi375 $\Delta thyA$ lower epithelial infection rate was also observed during infection of NCI H-292 human bronchial epithelial cells (Euba et al., 2015c), for both adhesion and invasion (Figure 4B). NTHi375 $\Delta thyA$ grown in sBHI showed lower adhesion to NCI H-292 cells than the WT strain, which was restored by thymidine supplementation, and adhesion by NTHi375 $\Delta thyA$ grown in sBHI+Thy was higher than that shown by the WT strain (Figure 4B, right).

Complement opsonization, specifically C3, has been shown to enhance the bacterium-epithelial cell interaction for poorly encapsulated strains (de Astorza et al., 2004). Based on the observed differential C3b deposition by NTHi375 WT and $\Delta thyA$ strains, we next tested the effect of C3 in NTHi infection of A549 cells. NTHi375 and NTHi375 $\Delta thyA$ strains were grown on chocolate agar ($\Delta thyA$) or chocolate+Thy ($\Delta thyA$ +Thy), and A549 cells were infected in the presence of human purified C3, C3-deficient serum, or C3-deficient serum reconstituted with human purified C3. The level of bacterial attachment did not change in the presence of C3, compared to that observed in control untreated cells (CON) or cells co-incubated with C3-deficient serum (Figure S4B).

In summary, thymidine auxotrophy modified NTHi ability to infect airway epithelial cells in terms of bacterial location and triggered inflammatory response. Changes in adhesion and IL-8 secretion could be restored by addition of external thymidine in the bacterial growth medium. The presence of C3 at the onset of infection did not modulate bacterial adhesion.

Inactivation of the *thyA* Gene Attenuates *H. influenzae* Virulence and Confers Advantage under TxS Treatment *In vivo*

Finally, we sought to determine the impact of thymidine auxotrophy *in vivo*, by using a mouse NTHi respiratory infection model system previously used for NTHi375 (Morey et al., 2013; Euba et al., 2015a,b). Mice were infected with NTHi375 WT and *thyA* mutant strains grown on chocolate agar, and bacterial loads were quantified in lungs and BALF samples at 12, 24, and 48 hpi. In lungs, NTHi375 $\Delta thyA$ bacterial numbers were lower than those recovered for the WT strain at the three infection time



points tested. Thymidine dependency was also associated with significantly reduced bacterial counts in BALF at 12 and 24 hpi (Figures 5A,B).

To further investigate if thymidine auxotrophy, despite attenuation, confers an advantage to *H. influenzae* under TxS treatment, we used a therapeutic regimen consisting of one TxS dose (960 mg/kg, 1:5 TMP:SMX) every 6 h, starting at 6 hpi. Results indicate that TxS treatment was more efficient in reducing bacterial counts of the WT than of the *thyA* mutant strain. Thus, a significant reduction of the WT population in lungs at 12, 24, and 48 hpi, and BALF samples at 24 hpi, was observed under treated—compared to that of untreated conditions. In contrast, bacterial counts of NTHi375 $\Delta thyA$ were unchanged at 12 and 24

hpi in both lungs and BALFs, despite TxS administration. The protective effect of *thyA* mutation against TxS was not observed at 48 hpi, maybe due to NTHi375 $\Delta thyA$ severe clearance at this post-infection time point.

Based on the differences observed at 24 hpi, we attempted to restore the *thyA* mutant phenotypes by infecting with mutant bacteria previously grown in the presence of thymidine. However, intranasal inoculation of NTHi375 $\Delta thyA$ grown on chocolate+Thy did not restore bacterial counts, and lung and BALF counts for NTHi375 WT were higher than those obtained for $\Delta thyA$ grown on chocolate+Thy. Unexpectedly, NTHi375 $\Delta thyA$ previous growth on chocolate+Thy increased TxS efficiency, i.e., in TxS treated animals, lung, and BALF counts

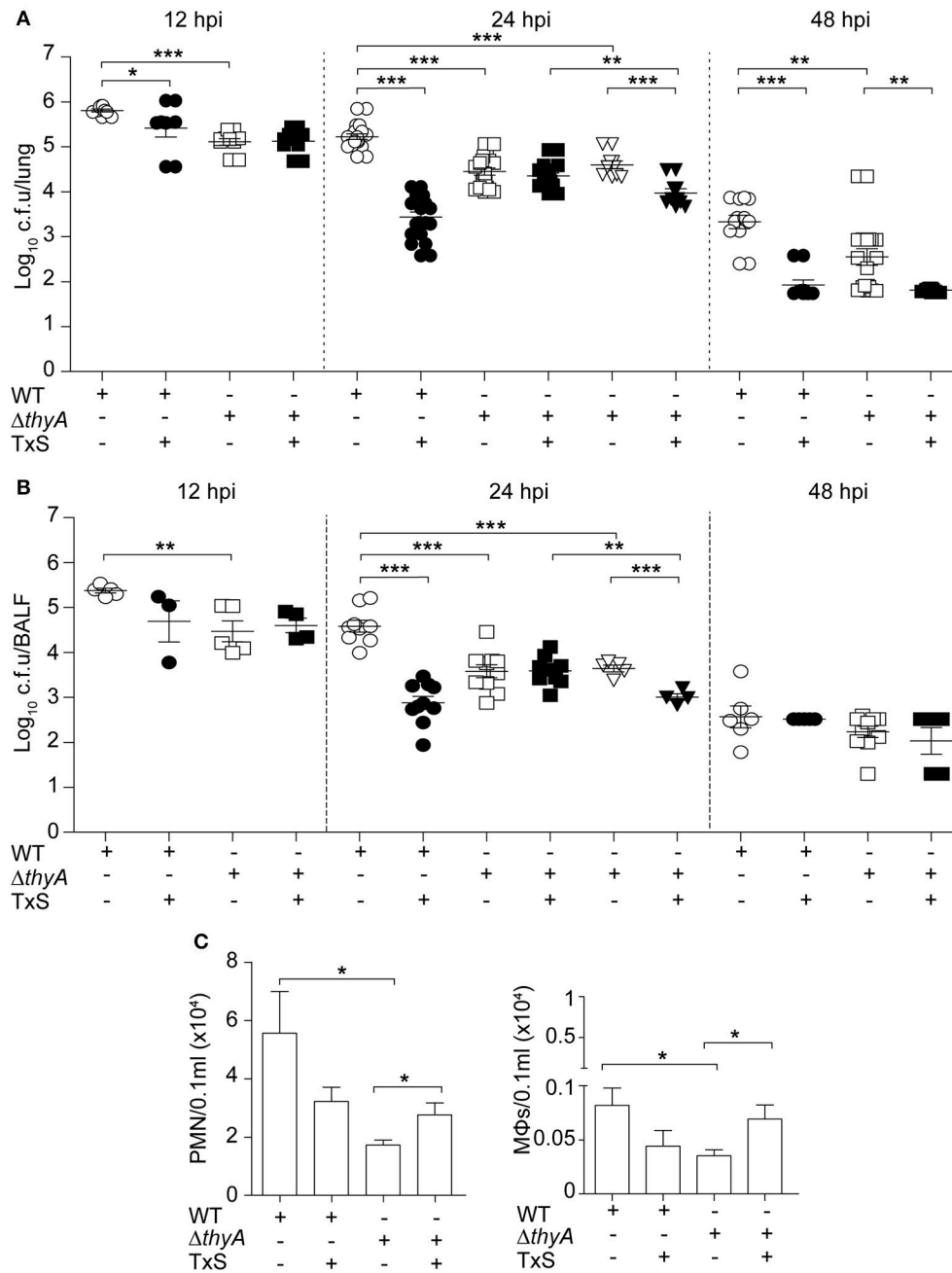


FIGURE 5 | Inactivation of the *thyA* gene attenuates *H. influenzae* virulence and confers advantage under TxS treatment *in vivo*. CD1 mice were infected with $\sim 2 \times 10^7$ bacteria/mouse of NTHi375 WT (circle) or $\Delta thyA$ (square) strains. When necessary, a therapeutic regimen consisting of 960 mg/kg TxS (1:5 TMP:SMX) was administered orally each 6 h (dark symbols). Mice were euthanized at 12, 24, and 48 hpi, and bacterial loads were quantified in lungs (\log_{10} c.f.u./lung) (A) and BALF (\log_{10} c.f.u./BALF) (B). NTHi375 $\Delta thyA$ showed significantly lower loads in lungs and BALFs at 12 (lung, $p < 0.05$; BALF, $p < 0.001$), 24 (lung, $p < 0.001$; BALF, $p < 0.001$), and 48 (lung, $p < 0.01$ hpi) than those shown by the WT strain. TxS administration significantly reduced WT strain recovery from lungs and BALF samples at 12 (lung, $p < 0.05$), 24 (lung, $p < 0.001$; BALF, $p < 0.001$), and 48 (lung, $p < 0.001$ hpi, compared to WT infected untreated mice. Inverted triangles: CD1 mice were infected with $\sim 2 \times 10^7$ bacteria/mouse of $\Delta thyA$ strain previously grown on chocolate+Thy for 16 h; when necessary, a therapeutic regime consisting of 960 mg/kg TxS was administered orally each 6 h (dark inverted triangles). NTHi375 $\Delta thyA$ previously grown on chocolate+Thy rendered significantly lower loads in lungs and BALFs than the WT strain ($p < 0.001$); NTHi375 $\Delta thyA$ previously grown on chocolate+Thy showed significantly lower loads in lungs and BALFs of TxS treated—than in those of untreated mice ($p < 0.001$); in TxS treated mice, NTHi375 $\Delta thyA$ previously grown on chocolate+Thy showed lower loads in lungs and BALFs than NTHi375 $\Delta thyA$ previously grown on chocolate agar ($p < 0.01$). (C) BALF samples were analyzed for PMN (left) and alveolar macrophage (MΦ) counts at 12 hpi. Significantly higher numbers were observed in NTHi375 WT than in $\Delta thyA$ infected samples for both PMN ($p < 0.05$) and MΦs ($p < 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

were higher for NTHi375 Δ *thyA* grown on chocolate agar than for NTHi375 Δ *thyA* grown on chocolate+Thy. Also, lung and BALF counts for NTHi375 Δ *thyA* grown on chocolate+Thy were higher in untreated—than in TxS treated animals (**Figures 5A,B**).

Microscopy score of the average histopathological lesion in samples of mice infected with WT or Δ *thyA* strains was also determined along the respiratory tract, and compared for untreated and TxS-treated mice (**Table 3**). Histopathological analysis of upper airways, larynxes, tracheas, and lungs from mice intranasally infected with WT or with Δ *thyA* rendered inflammatory lesions. Lungs and airways from control mice instilled with PBS did not show significant inflammation or pathological changes, independently of TxS administration. In both WT and Δ *thyA*-infected mice, the upper airways showed PMN infiltration of the lamina propria and lumens. PMN infiltration was found in larger numbers in the lumens of Δ *thyA* infected mice than in those infected with WT bacteria, at both 12 and 24 hpi. Conversely, PMN infiltration of the upper airway lamina propria was found to be larger in WT—than in Δ *thyA* infected mice at 24 hpi. Mild PMN infiltration of the lamina propria and lumens containing red blood cells and PMNs were the main findings in larynxes and tracheas. A tendency towards increased red blood cells containing lumens in WT-infected compared to Δ *thyA* infected mice was apparent at 24 hpi, although the differences did not reach statistical significance. As previously described (Euba et al., 2015b), lungs in infected mice showed areas of acute bronchopneumonia where alveolar septa were thickened with edema and hyperemic septal capillaries. Neutrophils, alveolar macrophages and scattered small hemorrhages were observed in alveolar spaces. Comparison of scored lesions at 12 hpi showed significantly more hemorrhages at the lower airway of mice infected with WT than at those infected with Δ *thyA* bacteria in control untreated mice. Hemorrhages were also found in larger proportions at the alveoli of mice infected with NTHi375 at 12 than at 24 hpi, but a lower proportion of alveolar macrophages was found at the lower airway of mice infected with NTHi375 at 12 than at 24 hpi. Significant differences were not found at the alveoli of Δ *thyA* infected mice between post-infection time points. Analysis of scored lesions in the airways of WT infected mice showed differences between control untreated- and TxS treated-mice. We observed a higher proportion of PMN infiltration in (i) the upper airway lumens at 24 hpi in TxS treated—than in control untreated mice, and (ii) the alveoli in control untreated—than in TxS treated mice at 12 hpi. Conversely, Δ *thyA* infection caused comparable lesions in both untreated- and TxS treated-mice (**Table 3**). Intranasal inoculation of NTHi375 Δ *thyA* previously grown on chocolate+Thy rendered similar inflammatory lesions in both untreated- and TxS treated-animals; as a sole difference, a higher proportion of PMN infiltration was observed in the alveoli of TxS treated—than of control untreated mice ($p < 0.05$).

Last, we quantified accumulation of immune cells in the collected BALF samples at 12 hpi. NTHi375 WT pulmonary infection increased the accumulation of PMNs and alveolar macrophages, compared to that observed in the BALF of Δ *thyA* infected mice. TxS treatment showed a trend to reduce

immune cell accumulation in BALF samples of WT infected mice. Unexpectedly, TxS treatment increased immune cell accumulation in BALF samples of Δ *thyA* infected mice (for both PMNs and alveolar macrophages; **Figure 5C**).

In summary, thymidine auxotrophy reduces NTHi virulence but, concomitantly, it confers an advantage under TxS treatment *in vivo*, suggesting that uptake of external thymidine from the infected tissue may contribute to bypass the bactericidal effect of TxS. Moreover, overall higher inflammatory traits were observed in WT—than in Δ *thyA* infected mice.

DISCUSSION

First-line antimicrobial agents must be effective, reliable, widely available and affordable in resource-poor settings (Grant et al., 2009). Following this notion, oral TxS has been recommended for years as initial antibacterial for acute otitis media, non-severe pneumonia or AECOPD because of its effectiveness and reasonable price, which, in turn, has resulted in increased resistance patterns by frequent respiratory pathogens such as *H. influenzae*. Thus, *H. influenzae* increased TxS resistance has been reported in clinical isolates from serotypes b, e, and f, and non-typeable strains from various pathological origins (Rowe et al., 2000; Leiberman et al., 2001; Campos et al., 2003a,b; Arguedas et al., 2005; Mohd-Zain et al., 2012; Puig et al., 2014; Greenhill et al., 2015). Besides *H. influenzae* TxS resistance due to changes in the sequence and/or expression of the *folH* and *folP* genes, or acquisition of the *sul* genes (de Groot et al., 1988, 1996; Enne et al., 2002), TMP resistance has been reported to arise in this pathogen as an indirect result of mutation to thymidine/thymine auxotrophy (Platt et al., 1983). Standard procedures for determination of *H. influenzae* antibiotic susceptibility at diagnostic laboratories involve the use of the low thymidine containing medium MH-F, which could underestimate the frequency of thymidine-dependent TMP/TxS resistance. Indeed, the routine evaluation of NTHi clinical isolates carried out in this study reported a proportion of strains designated as forming slow-growing colonies, which prompted us to screen their thymidine dependency, leading to identification of the thymidine auxotroph NTHi8233. Compared to ThyA_{RdKW20}, ThyA_{NTHi8233} has a two-amino acid insertion at positions 90 and 91, which slightly modifies its predicted structure (Figure S1). Inactive *thyA* gene alleles have been reported for *S. aureus* due to in-frame deletions, deletions resulting in a frameshift, or point mutations resulting in amino acid transitions or non-sense mutations (Chatterjee et al., 2008; Kriegeskorte et al., 2014). In this study, we identified a NTHi *thyA* allele with an in-frame insertion compared to previously genome sequenced strains, which could alter its enzymatic activity. The ThyA canonical active site tryptophan (W83) proposed for bacterial sequences (Baugh et al., 2013) is conserved in ThyA_{NTHi8233}, and future work will attempt to purify ThyA_{NTHi8233} and further assess its thymidylate synthase activity.

Moreover, NTHi8233 thymidine auxotrophy was found to be reversible, and such reversion was associated to disappearance

TABLE 3 | Score of histopathological lesions found in the airways of control untreated or TxS treated mice, intranasally infected with NTHi375 WT or Δ thyA strains.

Strain	Treatment ^a /hpi	Score (mean \pm SD) ^b														
		Upper airways					Larynx-trachea					Lung				
		PMNs ^c lumen	PMNs lamina propria	Hyperemia	Red blood cells lumen	PMNs lamina propria	Hyperemia	Hemorrhage	Bronchial-alveolar PMNs	Alveolar macrophages						
NTHi375	Control/12 h	d ¹ 1.5 \pm 0.9	1.2 \pm 0.4	0.8 \pm 0.2	1.1 \pm 1.3	0.8 \pm 0.4	1.3 \pm 0.3	f ¹ 0.7 \pm 0.3	h ² \pm 0.5	i ¹ 0.7 \pm 0.2						
	TxS/12 h	1.1 \pm 0.6	1	1.1 \pm 0.4	0.5 \pm 1	0.7 \pm 0.3	1.5 \pm 0.7	0.3 \pm 0.5	h ¹ 1.3 \pm 0.2	0.5 \pm 0.4						
	Control/24 h	d ¹ 0.6 \pm 0.6	e ¹ 1.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2	1.4 \pm 0.9	0.7 \pm 0.2	1.7 \pm 0.6	i ⁰ 2 \pm 0.2	1.8 \pm 0.4	j ¹ 1.4 \pm 0.3						
	TxS/24 h	92.1 \pm 1.9	1 \pm 0.5	1.1 \pm 0.5	1.7 \pm 1.2	0.4 \pm 0.2	1.7 \pm 0.4	0.6 \pm 0.6	1.8 \pm 0.5	1.7 \pm 0.2						
NTHi375 Δ thyA	Control/12 h	d ² 2.5 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	1.5 \pm 0.8	0.7 \pm 0.3	1.1 \pm 0.4	f ⁰ 3 \pm 0.2	1.7 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2						
	TxS/12 h	2.1 \pm 0.4	0.9 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2	0.8 \pm 1.1	0.8 \pm 0.4	0.9 \pm 0.4	0.1 \pm 0.2	1.7 \pm 0.5	0.8 \pm 0.4						
	Control/24 h	d ¹ 1.7 \pm 1.1	e ⁰ 6.6 \pm 0.2	1 \pm 0.3	0.5 \pm 0.8	0.7 \pm 0.2	1.6 \pm 0.4	0.2 \pm 0.2	2 \pm 0.3	1.1 \pm 0.4						
	TxS/24 h	1.8 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3	0.5 \pm 1	0.6 \pm 0.4	1 \pm 0.4	0.1 \pm 0.2	1.9 \pm 0.4	1.1 \pm 0.2						

^aControl, animals administered vehicle solution; TxS, postinfection, one TxS dose was administered each 6 h.

^bStatistical comparisons of mean values were performed using one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD multiple-comparison test.

^cPMNs: infiltrates of polymorphonuclear cells.

^dMore recruitment of PMNs at the upper airway lumen of mice infected with NTHi375 Δ thyA than with WT at 12 and 24 hpi (both, $p < 0.05$).

^eMore recruitment of PMNs at the upper airway lamina propria of mice infected with WT than with Δ thyA bacteria at 24 hpi ($p < 0.05$).

^fHigher alveolar hemorrhage in the lungs of mice infected with WT than with Δ thyA bacteria at 12 hpi ($p < 0.05$).

^gLower proportion of PMNs at the upper airway lumen (24 hpi) of WT bacteria infected mice untreated than TxS treated ($p < 0.05$).

^hLarger proportion of PMNs at the alveoli (12 hpi) of WT bacteria infected mice untreated than TxS treated ($p < 0.05$).

ⁱHigher alveolar hemorrhage in the lungs of mice infected with WT bacteria at 12 than at 24 hpi ($p < 0.01$).

^jLower numbers of alveolar macrophages at the alveoli of mice infected with WT bacteria at 12 than at 24 hpi ($p < 0.01$).

of the in-frame insertion in the *thyA*_{NTHi8233} gene. This transient phenotype, in agreement with previous observations (Platt et al., 1983), prompts us to speculate that reversible thymidine auxotrophy may lead into the infrequent isolation of thymidine dependent NTHi strains from respiratory samples. In contrast, TxS resistance level remained unchanged in NTHi8233, independent of auxotrophy reversion. Of note, increased TMP resistance has been previously found in *H. influenzae* thymidine prototrophs isolated soon after isogenic thymidine auxotrophs recovery from sputum samples exposed to subinhibitory TMP concentrations, suggesting that TMP resistance could be the result of a suppressor mutation (Platt et al., 1983). Following this observation, the MIC of TMP for NTHi8233 was >32 µg/ml, independent of auxotrophy reversion. The mechanism(s) underlying TMP/TxS resistance in NTHi8233 is currently unknown and will be subject of future study.

Reversible thymidine auxotrophy has been widely shown for *S. aureus* thymidine dependent-SCVs (Kahl, 2014), and made NTHi8233 inadequate for analysis of the impact of thymidine dependency on NTHi pathogenesis. For this purpose, the *thyA* gene was inactivated in strains NTHi375 and RdKW20. NTHi *thyA* mutants displayed alterations in morphology and growth, and dependence on external thymidine, comparable to those shown by *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, or *S. maltophilia* thymidine auxotrophs (Kok et al., 2001; Kahl et al., 2003, 2005; Anderson et al., 2007; Chatterjee et al., 2008). Moreover, NTHi *thyA* gene disruption caused a reduced PCho level and C3b deposition, impaired airway epithelial adhesion and invasion, and enhanced secretion of IL-8 by cultured epithelial cells. In some cases, minor phenotypic differences were observed between NTHi375 and RdKW20 *thyA* mutants, likely to be related to the known NTHi genomic heterogeneity (De Chiara et al., 2014). Altogether, the observed *in vitro* phenotypes, such as a deficient interaction with—and an increased inflammatory response by cultured airway epithelial cells upon infection by Δ *thyA* mutant strains, are likely to contribute to NTHi thymidine auxotroph attenuation upon murine lung infection. Modification of the biology of infection due to thymidine auxotrophy has been reported for other bacterial pathogens including *S. aureus*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, or *Vibrio cholerae* (Attridge, 1995; Cersini et al., 1998; Kok et al., 2001; Kriegeskorte et al., 2014). We acknowledge that a limitation of this study is the lack of genetic complementation for the *thyA* gene inactivation. Several approaches were unsuccessfully undertaken for plasmid-encoded *thyA*_{RdKW20} gene complementation into RdKW20 Δ *thyA*, and plasmid-encoded heterologous expression of the *thyA*_{NTHi8233} allele into RdKW20 Δ *thyA* (data not shown). Of note, we exclude a relationship between the *thyA* gene-related phenotypes shown in this study and overexpression of the immediately downstream gene, a putative homolog of the *tadA* gene encoding a tRNA-specific adenosine deaminase, in the *thyA* mutants (data not shown). Overexpression of the *tadA* gene has been shown to confer resistance to the bactericidal natural product xanthorrhizol in *E. coli* (Yogiara et al., 2015). Importantly, addition of external thymidine in the growth media restored, partial or totally, all analyzed *in vitro* phenotypes. Attenuation of NTHi375 Δ *thyA* *in vivo* was not restored by infecting bacteria previously grown in the presence of external thymidine, which

could be due to the observed partial restoration of thymidine prototrophy by available external thymidine, shown to be dependent on thymidine concentration on MH-F agar.

In addition to the impact of thymidine auxotrophy by inactivation of the *thyA* gene on NTHi virulence, TxS resistance was shown to increase in the Δ *thyA* mutant strains. Disruption of the *thyA* gene has been related to increased TMP resistance in other bacteria (Song et al., 2016). In agreement, the MIC of TMP was 1 and >32 µg/ml for NTHi375 WT and Δ *thyA* strains, respectively, and was 0.75 and >32 µg/ml for RdKW20 WT and Δ *thyA* strains, respectively. NTHi375 Δ *thyA* pre-grown in chocolate+Thy was cleared faster in TxS-treated than in untreated mice, and the reason(s) for this observation is currently unknown. Although, originally intended to restore the observed increased expression of the *nupC* gene upon *thyA* inactivation, mutant pre-growth in sBHI with thymidine further amplified *nupC* expression, compared to sBHI. It should be noted that increased *nupC* gene expression by a *thyA* mutant in *S. aureus* was previously restored by complementing *thyA* gene disruption (Chatterjee et al., 2008). Our observation was unexpected and formally incomparable to that made for *S. aureus*. We speculate that it could be associated with the lack of growth inhibition around TxS discs observed for *thyA* mutant strains when pre-grown in chocolate+Thy, therefore suggesting that uptake of external thymidine by the NupC nucleoside transporter could contribute to circumvent the effects of TxS upon *de novo* thymidylate biosynthesis in NTHi. We suggest here for the first time that NupC could function as a primary thymidine transporter in NTHi if *de novo* thymidylate synthesis is blocked. Search in all available genome sequenced *H. influenzae* strains did not reveal the presence of additional nucleoside transporters in this bacterial species. As expected, we unsuccessfully attempted to generate a NTHi double mutant strain lacking both the *thyA* and *nupC* genes (data not shown), further supporting the proposed role for NupC.

Three additional aspects deserve further discussion. First, *S. aureus* thymidine dependent SCVs grow on Columbia blood agar (Kriegeskorte et al., 2014); *S. maltophilia* thymidine dependent SCVs grow on sheep blood-, brucella-, and chocolate-agar (Anderson et al., 2007), but neither grow on MacConkey agar and M9 minimal medium (Anderson et al., 2007), nor *S. typhimurium thyA* mutants grow on LB agar (Kok et al., 2001). Our results show that NTHi Δ *thyA* thymidine auxotrophs grow rendering normal size colonies on chocolate—and sBHI-agar, but fail to grow on MH-F agar. Therefore, we may not consider the term thymidine dependent SCVs for *H. influenzae*. Second, *S. aureus* SCVs are recovered from several human and animal specimens, and are a highly dynamic subpopulation optimized for persistence, enabling the bacteria to hide inside the host cell without eliciting a strong host response (Kahl, 2014; Kahl et al., 2016). This may be unlikely for NTHi thymidine auxotrophs, given that we observed a significantly impaired airway epithelial cell invasion by the NTHi375 Δ *thyA* mutant strain. Third, this study does not tackle the induction of NTHi thymidine auxotrophy by TxS challenge, and we therefore cannot speculate on the selection for thymine auxotrophs and TxS resistance due to prolonged antibiotic exposure. Unexpectedly, no statistically significant connection has been found between

regional TxS use and resistance among *H. influenzae* isolates (Karpanoja et al., 2008). We should also consider the potential emergence of mutations in the *thyA* gene as a consequence of treatment with other antibiotics with mutagenic activity such as ciprofloxacin, which concomitantly increases TMP resistance (Song et al., 2016). Hence, emergence of TxS resistance in response to exposure to antibiotics needs further analysis and continuous monitoring.

In conclusion, this study shows for the first time the impact of thymidine auxotrophy by disruption of the thymidylate synthase *thyA* on *H. influenzae* morphology and interplay with the host airway and, indirectly, on its resistance to TxS. We also show NupC as a potential facilitator of external thymidine uptake upon inhibition of thymidylate *de novo* synthesis. Thymidine auxotrophy lowers NTHi virulence, but also provides an advantage under TxS exposure. Thus, our results should be considered for the consequences of TxS administration in the clinical settings. Further studies will contribute to better assess the emergence of NTHi thymidine auxotrophs in clinical samples, likely to be currently underestimated, and to understand if NTHi thymidine dependency may be a response to antibiotic treatment with a survival advantage in specific environments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IR, SM, BE, AF, JM, NL, MB, JR, FT, and CL have participated in the design and fulfillment of the experimental work. IR, SM, CA, JL, JY, and JG carried out in the conceptual design of the study.

IR, SM, JL, JY, and JG have written the manuscript (text, tables, and figures). All authors have participated in the correction of the manuscript to its final version.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the staff of the Microbiology Laboratory of Bellvitge University Hospital who contributed to this project on a daily basis. IR is funded by a Ph.D. studentship from Universidad Pública de Navarra, Spain; JM is funded by Ph.D. studentship BES-2013-062644 from Ministerio Economía y Competitividad-MINECO, Spain; SM is funded by a postdoctoral contract from CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES); NL is funded by a contract from Department of Economy, Regional Govern from Navarra, Spain, reference 0011-1307-2015-000037. This work has been funded by grants from MINECO SAF2012-31166 and SAF2015-66520-R, Health Department, Regional Govern from Navarra, Spain, reference 03/2016, and SEPAR 31/2015 to JG. CIBERES is an initiative from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain. We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00266/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Agrawal, A., and Murphy, T. F. (2011). *Haemophilus influenzae* infections in the *H. influenzae* type b conjugate vaccine era. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3728–3732. doi: 10.1128/JCM.05476-11
- Allen, S., Zaleski, A., Johnston, J. W., Gibson, B. W., and Apicella, M. A. (2005). Novel sialic acid transporter of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 73, 5291–5300. doi: 10.1128/IAI.73.9.5291-5300.2005
- Anderson, S. W., Stapp, J. R., Burns, J. L., and Qin, X. (2007). Characterization of small-colony-variant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 45, 529–535. doi: 10.1128/JCM.01444-06
- Arguedas, A., Sierra, H., Soley, C., Guevara, S., and Brilla, E. (2005). Activity of trimethoprim-sulfamethoxazole against middle ear fluid pathogens obtained from Costa Rican children with otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, 839–841. doi: 10.1097/01.inf.0000177286.40817.10
- Attridge, S. R. (1995). Thymine auxotrophy as an attenuating marker in *Vibrio cholerae*. *Microb. Pathog.* 19, 11–18. doi: 10.1006/mpat.1995.0040
- Barnes, P. J. (2016). Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 16–27. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.011
- Baugh, L., Gallagher, L. A., Patrapuvich, R., Clifton, M. C., Gardberg, A. S., Edwards, T. E., et al. (2013). Combining functional and structural genomics to sample the essential Burkholderia structome. *PLoS ONE* 8:e53851. doi: 10.1371/journal.pone.0053851
- Besier, S., Zander, J., Siegel, E., Saum, S. H., Hunfeld, K. P., Ehrhart, A., et al. (2008). Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants: human pathogens that are relevant not only in cases of cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3829–3832. doi: 10.1128/JCM.01440-08
- Campos, J., Roman, F., Perez-Vazquez, M., Aracil, B., Oteo, J., Cercenado, E., et al. (2003a). Antibiotic resistance and clinical significance of *Haemophilus influenzae* type f. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 961–966. doi: 10.1093/jac/dkh004
- Campos, J., Roman, F., Perez-Vazquez, M., Oteo, J., Aracil, B., Cercenado, E., et al. (2003b). Infections due to *Haemophilus influenzae* serotype E: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Infect. Dis.* 37, 841–845. doi: 10.1086/377232
- Cersini, A., Salvia, A. M., and Bernardini, M. L. (1998). Intracellular multiplication and virulence of *Shigella flexneri* auxotrophic mutants. *Infect. Immun.* 66, 549–557.
- Chatterjee, I., Kriegeskorte, A., Fischer, A., Deiwick, S., Theimann, N., Proctor, R. A., et al. (2008). *In vivo* mutations of thymidylate synthase (encoded by *thyA*) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190, 834–842. doi: 10.1128/JB.00912-07
- Clementi, C. F., and Murphy, T. F. (2011). Non-typeable *Haemophilus influenzae* invasion and persistence in the human respiratory tract. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 1:1. doi: 10.3389/fcimb.2011.00001
- de Astorza, B., Cortes, G., Crespi, C., Saus, C., Rojo, J. M., and Alberti, S. (2004). C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect. Immun.* 72, 1767–1774. doi: 10.1128/IAI.72.3.1767-1774.2004
- De Chiara, M., Hood, D., Muzzi, A., Pickard, D. J., Perkins, T., Pizza, M., et al. (2014). Genome sequencing of disease and carriage isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* identifies discrete population structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 5439–5444. doi: 10.1073/pnas.1403353111
- de Groot, R., Campos, J., Moseley, S. L., and Smith, A. L. (1988). Molecular cloning and mechanism of trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 477–484. doi: 10.1128/AAC.32.4.477

- de Groot, R., Sluiter, M., de Bruyn, A., Campos, J., Goessens, W. H., Smith, A. L., et al. (1996). Genetic characterization of trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2131–2136.
- Enne, V. I., King, A., Livermore, D. M., and Hall, L. M. (2002). Sulfonamide resistance in *Haemophilus influenzae* mediated by acquisition of sul2 or a short insertion in chromosomal folP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1934–1939. doi: 10.1128/AAC.46.6.1934-1939.2002
- Euba, B., Moleres, J., Segura, V., Viadas, C., Morey, P., Moranta, D., et al. (2015a). Genome expression profiling-based identification and administration efficacy of host-directed antimicrobial drugs against respiratory infection by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7581–7592. doi: 10.1128/AAC.01278-15
- Euba, B., Moleres, J., Viadas, C., Barberan, M., Caballero, L., Grillo, M. J., et al. (2015b). Relationship between azithromycin susceptibility and administration efficacy for nontypeable *Haemophilus influenzae* respiratory infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2700–2712. doi: 10.1128/AAC.04447-14
- Euba, B., Moleres, J., Viadas, C., Ruiz de los Mozos, I., Valle, J., Bengochea, J. A., et al. (2015c). Relative contribution of P5 and Hap surface proteins to nontypeable *Haemophilus influenzae* interplay with the host upper and lower airways. *PLoS ONE* 10:e0123154. doi: 10.1371/journal.pone.0123154
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269, 496–512. doi: 10.1126/science.7542800
- Grant, G. B., Campbell, H., Dowell, S. F., Graham, S. M., Klugman, K. P., Mulholland, E. K., et al. (2009). Recommendations for treatment of childhood non-severe pneumonia. *Lancet Infect. Dis.* 9, 185–196. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70044-1
- Greenhill, A. R., Phuanukoonnon, S., Michael, A., Yoannes, M., Orami, T., Smith, H., et al. (2015). *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in paediatric meningitis patients at Goroka General Hospital, Papua New Guinea: serotype distribution and antimicrobial susceptibility in the pre-vaccine era. *BMC Infect. Dis.* 15:485. doi: 10.1186/s12879-015-1197-0
- Herriott, R. M., Meyer, E. Y., Vogt, M., and Modan, M. (1970). Defined medium for growth of *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 101, 513–516.
- Hood, D. W., Makepeace, K., Deadman, M. E., Rest, R. F., Thibault, P., Martin, A., et al. (1999). Sialic acid in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: strain distribution, influence on serum resistance and structural characterization. *Mol. Microbiol.* 33, 679–692. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01509.x
- Iyer Parameswaran, G., and Murphy, T. F. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease: role of bacteria and updated guide to antibacterial selection in the older patient. *Drugs Aging* 26, 985–995. doi: 10.2165/11315700-000000000-00000
- Kahl, B. C. (2014). Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*-a bacterial survival strategy. *Infect. Genet. Evol.* 21, 515–522. doi: 10.1016/j.meegid.2013.05.016
- Kahl, B. C., Becker, K., and Löffler, B. (2016). Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 401–427. doi: 10.1128/CMR.00069-15
- Kahl, B. C., Belling, G., Becker, P., Chatterjee, I., Wardecki, K., Hilgert, K., et al. (2005). Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect. Immun.* 73, 4119–4126. doi: 10.1128/IAI.73.7.4119-4126.2005
- Kahl, B. C., Belling, G., Reichelt, R., Herrmann, M., Proctor, R. A., and Peters, G. (2003). Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J. Clin. Microbiol.* 41, 410–413. doi: 10.1128/JCM.41.1.410-413.2003
- Karpanoja, P., Nyberg, S. T., Bergman, M., Voipio, T., Paakkari, P., Huovinen, P., et al. (2008). Connection between trimethoprim-sulfamethoxazole use and resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2480–2485. doi: 10.1128/AAC.01118-07
- Kok, M., Bühlmann, E., and Pechère, J.-C. (2001). *Salmonella typhimurium* thyA mutants fail to grow intracellularly *in vitro* and are attenuated in mice. *Microbiology* 147, 727–733. doi: 10.1099/00221287-147-3-727
- Kriegeskorte, A., Block, D., Drescher, M., Windmüller, N., Mellmann, A., Baum, C., et al. (2014). Inactivation of thyA in *Staphylococcus aureus* attenuates virulence and has a strong impact on metabolism and virulence gene expression. *mBio* 5:e01447-14. doi: 10.1128/mBio.01447-14
- Lazaro-Diez, M., Navascues-Lejarza, T., Remuzgo-Martinez, S., Navas, J., Icardo, J. M., Acosta, F., et al. (2016). *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii* clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells *in vitro*. *Microbes Infect.* 18, 559–564. doi: 10.1016/j.micinf.2016.05.002
- Leiberman, A., Leibovitz, E., Piglansky, L., Raiz, S., Press, J., Yagupsky, P., et al. (2001). Bacteriologic and clinical efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole for treatment of acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20, 260–264. doi: 10.1097/00006454-2001103000-00009
- Lopez-Gomez, A., Cano, V., Moranta, D., Morey, P., Garcia del Portillo, F., Bengochea, J. A., et al. (2012). Host cell kinases, $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrins, and Rac1 signalling on the microtubule cytoskeleton are important for non-typeable *Haemophilus influenzae* invasion of respiratory epithelial cells. *Microbiology* 158(Pt 9), 2384–2398. doi: 10.1099/mic.0.059972-0
- Lorian, V. (1996). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Philadelphia, PA: Williams and Wilkins.
- Maskell, R., Okubadejo, O. A., Payne, R. H., and Pead, L. (1978). Human infections with thymine-requiring bacteria. *J. Med. Microbiol.* 11, 33–45. doi: 10.1099/00222615-11-1-33
- Mell, J. C., Sinha, S., Balashov, S., Viadas, C., Grassa, C. J., Ehrlich, G. D., et al. (2014). Complete genome sequence of *Haemophilus influenzae* strain 375 from the middle ear of a pediatric patient with otitis media. *Genome Announc.* 2:e01245-14. doi: 10.1128/genomeA.01245-14
- Mell, J. C., Viadas, C., Moleres, J., Sinha, S., Fernandez-Calvet, A., Porsch, E. A., et al. (2016). Transformed recombinant enrichment profiling rapidly identifies HMW1 as an intracellular invasion locus in *Haemophilus influenzae*. *PLoS Pathog.* 12:e01005576. doi: 10.1371/journal.ppat.1005576
- Meng, G., Spahich, N., Kenjale, R., Waksman, G., and St Geme, J. W. III. (2011). Crystal structure of the *Haemophilus influenzae* Hap adhesin reveals an intercellular oligomerization mechanism for bacterial aggregation. *EMBO J.* 30, 3864–3874. doi: 10.1038/emboj.2011.279
- Mohd-Zain, Z., Kamsani, N. H., Ismail, I. S., and Ahmad, N. (2012). Antibiotic susceptibility profile of *Haemophilus influenzae* and transfer of co-trimoxazole resistance determinants. *Trop. Biomed.* 29, 372–380. Available online at: <https://drive.google.com/file/d/0B75lxc0mfp2OckRZZHdtVXRUWHM/view>
- Morey, P., Cano, V., Marti-Llitas, P., Lopez-Gomez, A., Regueiro, V., Saus, C., et al. (2011). Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypeable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology* 157(Pt 1), 234–250. doi: 10.1099/mic.0.040451-0
- Morey, P., Viadas, C., Euba, B., Hood, D. W., Barberan, M., Gil, C., et al. (2013). Relative contributions of lipooligosaccharide inner and outer core modifications to nontypeable *Haemophilus influenzae* pathogenesis. *Infect. Immun.* 81, 4100–4111. doi: 10.1128/IAI.00492-13
- Mwenya, D. M., Charalambous, B. M., Phillips, P. P. J., Mwansa, J. C. L., Batt, S. L., Nunn, A. J., et al. (2010). Impact of cotrimoxazole on carriage and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in HIV-infected children in Zambia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3756–3762. doi: 10.1128/AAC.01409-09
- Nouira, S., Marghli, S., Besbes, L., Boukef, R., Daami, M., Nciri, N., et al. (2010). Standard versus newer antibacterial agents in the treatment of severe acute exacerbation of chronic Obstructive Pulmonary Disease: a randomized trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus ciprofloxacin. *Clin. Infect. Dis.* 51, 143–149. doi: 10.1086/653527
- Platt, D. J., Guthrie, A. J., and Langan, C. F. (1983). The isolation of thymidine-requiring *Haemophilus influenzae* from the sputum of chronic bronchitic patients receiving trimethoprim. *J. Antimicrob. Chemother.* 11, 281–286. doi: 10.1093/jac/11.3.281
- Puig, C., Grau, I., Marti, S., Tubau, F., Calatayud, L., Pallares, R., et al. (2014). Clinical and molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease in adult patients. *PLoS ONE* 9:e112711. doi: 10.1371/journal.pone.0112711
- Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., Campuzano, S., Moscoso, M., Gonzalez-Camacho, F., Domenech, M., et al. (2015). Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infect. Immun.* 83, 591–603. doi: 10.1128/IAI.02811-14
- Remuzgo-Martinez, S., Lazaro-Diez, M., Mayer, C., Aranzamendi-Zaldumbide, M., Padilla, D., Calvo, J., et al. (2015). Biofilm formation and quorum-sensing-molecule production by clinical isolates of *Serratia liquefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3306–3315. doi: 10.1128/AEM.00088-15

- Rowe, A. K., Deming, M. S., Schwartz, B., Wasas, A., Rolka, D., Rolka, H., et al. (2000). Antimicrobial resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from children in the Central African Republic. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19, 438–444. doi: 10.1097/00006454-200005000-00009
- Sethi, S. (2010). Infection as a comorbidity of COPD. *Eur. Respir. J.* 35, 1209–1215. doi: 10.1183/09031936.00081409
- Sinha, S., Mell, J. C., and Redfield, R. J. (2012). Seventeen Sxy-dependent cyclic AMP receptor protein site-regulated genes are needed for natural transformation in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 194, 5245–5254. doi: 10.1128/JB.00671-12
- Song, L. Y., Goff, M., Davidian, C., Mao, Z., London, M., Lam, K., et al. (2016). Mutational consequences of ciprofloxacin in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6165–6172. doi: 10.1128/AAC.01415-16
- Stryer, L. (1995). “Biosynthesis of nucleotides,” in *Biochemistry*, ed L. Stryer (New York, NY: W.H. Freeman and Company), 739–762.
- Tracy, E., Ye, F., Baker, B. D., and Munson, R. S. Jr. (2008). Construction of non-polar mutants in *Haemophilus influenzae* using FLP recombinase technology. *BMC Mol. Biol.* 9:101. doi: 10.1186/1471-2199-9-101
- Tristram, S., Jacobs, M. R., and Appelbaum, P. C. (2007). Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 368–389. doi: 10.1128/CMR.00040-06
- Wang, L., Hames, C., Schmidl, S. R., and Stülke, J. (2010). Upregulation of thymidine kinase activity compensates for loss of thymidylate synthase activity in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 77, 1502–1511. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07298.x
- Weiser, J. N., Pan, N., McGowan, K. L., Musher, D., Martin, A., and Richards, J. (1998). Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J. Exp. Med.* 187, 631–640. doi: 10.1084/jem.187.4.631
- Yogiara., Kim, D., Hwang, J. K., and Pan, J. G. (2015). *Escherichia coli* ASKA clone library harboring tRNA-specific adenosine deaminase (tadA) reveals resistance towards Xanthorrhizol. *Molecules* 20, 16290–16305. doi: 10.3390/molecules200916290

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Rodríguez-Arce, Martí, Euba, Fernández-Calvet, Moleres, López-López, Barberán, Ramos-Vivas, Tubau, Losa, Ardanuy, Leiva, Yuste and Garmendia. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.