

Table S1: Strains and plasmids used in this study

Strain	Genotype	Reference
VL1	D39V, Serotype 2 strain	1
VL333	D39V, $\Delta prsI::P_{F6-lacI-tetR}$ (<i>gen</i>)	2
VL783	D39V, <i>comC::ery</i>	3
VL995	D39V, <i>AprsI::P_{F6-lacI}</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac-dCas9sp}</i> (<i>tet</i>), <i>cil::P_{3-luc}</i> (<i>kan</i>), <i>cep::P_{3-sgRNA}luc1</i> (<i>spc</i>)	4
VL996	D39V, <i>AprsI::P_{F6-lacI}</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac-dCas9sp}</i> (<i>tet</i>), <i>cil::P_{3-luc}</i> (<i>kan</i>), <i>cep::pPEPX</i> (<i>spc</i>)	4
VL997	D39V, $\Delta prsI::P_{F6-lacI}$ (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac-dCas9sp}</i> (<i>tet</i>), <i>cil::P_{3-luc}</i> (<i>kan</i>)	4
VL1998	DCI23, $\Delta prsI::P_{F6-lacI}$ (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac-dCas9sp}</i> (<i>tet</i>)	4
VL2969	D39V, $\Delta ply::camR$, <i>cil::kanR</i>	Veening lab collection
VL3251	D39V, <i>AprsI::P_{F6-lacI}</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac-dCas9sp}</i> (<i>tet</i>), <i>cil::P_{3-luc}</i> (<i>kan</i>), <i>cep::P_{3-BS1-sgRNA}luc</i> (<i>spc</i>)	This study
VL3252	D39V, <i>AprsI::P_{F6-lacI}</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac-dCas9sp}</i> (<i>tet</i>), <i>cil::P_{3-luc}</i> (<i>kan</i>), <i>cep::P_{3-BS2-sgRNA}luc</i> (<i>spc</i>)	This study
VL3253	D39V, <i>AprsI::P_{F6-lacI}</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac-dCas9sp}</i>	This study

	(<i>tet</i>), <i>cil::P₃-luc</i> (<i>kan</i>), <i>cep::P₃-BS3-sgRNA_{luc}</i> (<i>spc</i>)	
VL3254	D39V, <i>Aprs1::P_{F6}-lacI</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac}-dCas9_{sp}</i> (<i>tet</i>), <i>cil::P₃-luc</i> (<i>kan</i>), <i>cep::P₃-BS4-sgRNA_{luc}</i> (<i>spc</i>)	This study
VL3255	D39V, <i>Aprs1::P_{F6}-lacI</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac}-dCas9_{sp}</i> (<i>tet</i>), <i>cil::P₃-luc</i> (<i>kan</i>), <i>cep::P₃-BS5-sgRNA_{luc}</i> (<i>spc</i>)	This study
VL3256	D39V, <i>Aprs1::P_{F6}-lacI</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac}-dCas9_{sp}</i> (<i>tet</i>), <i>cil::P₃-luc</i> (<i>kan</i>), <i>cep::P₃-BS6-sgRNA_{luc}</i> (<i>spc</i>)	This study
VL3308	D39V, <i>Δprs1::P_{F6}-lacI- tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac}- dCas9_{sp}</i> (<i>tet</i>)	This study
VL3309	D39V, <i>Δprs1::P_{F6}-lacI</i> (<i>gen</i>), <i>zip::P_{lac}- mNeonGreen-opt-TEV- mScarlet1-opt</i> (<i>spc</i>)	Veening lab collection
VL3312	D39V, <i>Δprs1::P_{F6}-lacI</i> (<i>gen</i>), <i>zip::P_{lac}- mNeonGreen-opt-TEV- mTurquoise2-opt</i> (<i>spc</i>)	Veening lab collection
VL3436	D39V, <i>Δprs1::P_{F6}-lacI- tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA::P_{lac}- dCas9_{sp}</i> (<i>tet</i>), <i>cep::P₃- BS3-sgRNA2</i> (<i>spc</i>)	This study

VL3437	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>cep</i> ::P ₃ -BS6-sgRNA3 (<i>spc</i>)	This study
VL3438	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>cep</i> ::P ₃ -BS2-sgRNA6 (<i>spc</i>)	This study
VL3439	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>cep</i> ::P ₃ -BS3-sgRNA2 (<i>spc</i>), <i>zip</i> ::P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt</i> (<i>ery</i>)	This study
VL3440	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>cep</i> ::P ₃ -BS3-sgRNA2 (<i>spc</i>), <i>zip</i> ::P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt</i> (<i>ery</i>)	This study
VL3441	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>cep</i> ::P ₃ -BS2-sgRNA6 (<i>spc</i>), <i>zip</i> ::P ₃ -BS6- <i>mScarletI-opt</i> (<i>ery</i>)	This study
VL3660	D39V, <i>Δcps</i>	Veening lab collection
VL3703	D39V, P _{cps} :: <i>tetM-tetR</i> -P _{tet} - <i>cps</i> (<i>tet</i>)	²
VL3746 (Strain 1)	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>zip</i> ::P ₃ -BS6-sgRNA3-P ₃ -BSA2- <i>mNeonGreen-opt</i> (<i>ery</i>)	This study

VL3747 (Strain 2)	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>cep</i> ::P ₃ -BS6- <i>mScarletI-opt</i> -P ₃ -BS3- <i>sgRNA2</i> (<i>spc</i>)	This study
VL3748 (Strain 3)	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>cil</i> ::P ₃ -BS3- <i>mTurquoise2-opt</i> -P _{tet} -BS2- <i>sgRNA6</i> (<i>kan</i>)	This study
VL3749 (Strain 4)	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>cil</i> ::P ₃ -BS3- <i>mTurquoise2-opt</i> -P ₃ -BS2- <i>sgRNA6</i> (<i>kan</i>)	This study
VL3750 (Int Strain)	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>zip</i> ::P ₃ -BS6- <i>sgRNA3</i> -P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt</i> (<i>ery</i>), <i>cep</i> ::P ₃ -BS6- <i>mScarletI-opt</i> -P ₃ -BS3- <i>sgRNA2</i> (<i>spc</i>)	This study
VL3752 (Strain 5)	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>zip</i> ::P ₃ -BS6- <i>sgRNA3</i> -P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt</i> (<i>ery</i>), <i>cep</i> ::P ₃ -BS6- <i>mScarletI-opt</i> -P ₃ -BS3- <i>sgRNA2</i> (<i>spc</i>), <i>cil</i> ::P ₃ -BS3- <i>mTurquoise2-opt</i> -P _{tet} -BS2- <i>sgRNA6</i> (<i>kan</i>)	This study
VL3753 (Strain 6)	D39V, <i>AprsI</i> ::P _{F6} - <i>lacI-tetR</i> (<i>gen</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} - <i>dCas9sp</i> (<i>tet</i>), <i>zip</i> ::P ₃ -BS6- <i>sgRNA3</i> -P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt</i> (<i>ery</i>),	This study

	<i>cep::P₃-BS6-mScarletI-opt-P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i> , <i>cil::P₃-BS3-mTurquoise2-opt-P₃-BS2-sgRNA6 (kan)</i>	
VL3755 (Strain5 +AC)	D39V, <i>Aprs1::P_{F6}-lacI-tetR (gen)</i> , <i>bgaA::Plac-dCas9sp (tet)</i> , <i>zip::P₃-BS6-sgRNA3-P₃-BS2-mNeonGreen-opt (ery)</i> , <i>cep::P₃-BS6-mScarletI-opt-P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i> , <i>cil::P₃-BS3-mTurquoise2-opt-P_{tet}-BS2-sgRNA6 (kan)</i> , <i>lytA::cat</i> , <i>comC::P_{comC}-tmp</i>	This study
VL3757 (Strain6 +AC)	D39V, <i>Aprs1::P_{F6}-lacI-tetR (gen)</i> , <i>bgaA::P_{lac}-dCas9sp (tet)</i> , <i>zip::P₃-BS6-sgRNA3-P₃-BS2-mNeonGreen-opt (ery)</i> , <i>cep::P₃-BS6-mScarletI-opt-P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i> , <i>cil::P₃-BS3-mTurquoise2-opt-P₃-BS2-sgRNA6 (kan)</i> , <i>lytA::cat</i> , <i>comC::P_{comC}-tmp</i>	This study
VL3869 (VL3755+del-cps)	D39V, <i>Aprs1::P_{F6}-lacI-tetR (gen)</i> , <i>bgaA::Plac-dCas9sp (tet)</i> , <i>zip::P₃-BS6-sgRNA3-P₃-BS2-mNeonGreen-opt (ery)</i> , <i>cep::P₃-BS6-mScarletI-opt-P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i> , <i>cil::P₃-BS3-mTurquoise2-opt-P_{tet}-BS2-sgRNA6 (kan)</i> , <i>lytA::cat</i> , <i>comC::P_{comC}-tmp</i> , <i>Δcps</i>	This study

VL3870	D39V, <i>bgaA::P_{lac}-dcas9sp (gen)</i>	This study
VL3872	D39V, P _{cps} :: <i>tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-cps (tet)</i>	This study
VL3873	D39V, P _{cps} :: <i>tetM-tetR-P₃-BssgRNA6-mScarletI-opt-cps (tet)</i> , <i>cep::P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i>	This study
VL3875	D39V, P _{cps} :: <i>tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-cps (tet)</i> , <i>cep::P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i> , <i>zip::P₃-BS6-sgRNA3-P₃-BS2-mNeonGreen-opt (ery)</i>	This study
VL3876	D39V, P _{cps} :: <i>tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-cps (tet)</i> , <i>cep::P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i> , <i>zip::P₃-BS6-sgRNA3-P₃-BS2-mNeonGreen-opt (ery)</i> , <i>cil::P₃-BS3-mTurquoise2-opt-P_{tet}-BS2-sgRNA6 (kan)</i>	This study
VL3877	D39V, P _{cps} :: <i>tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-cps (tet)</i> , <i>cep::P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i> , <i>zip::P₃-BS6-sgRNA3-P₃-BS2-mNeonGreen-opt (ery)</i> , <i>cil::P₃-BS3-mTurquoise2-opt-P₃-BS2-sgRNA6 (kan)</i>	This study
VL3878	D39V, P _{cps} :: <i>tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-cps (tet)</i> , <i>cep::P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i> , <i>zip::P₃-</i>	This study

	<p>BS6-sgRNA3-P₃-BS2-<i>mNeonGreen-opt (ery)</i>, <i>cil::P₃-BS3-mTurquoise2-opt-P_{tet}-BS2-sgRNA6 (kan)</i>, <i>bgaA::P_{lac}-dCas9sp (gen)</i></p> <p>Inducible CAPSULATOR 1.0</p>	
VL3879	<p>D39V, P_{cps}::<i>tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-cps (tet)</i>, <i>cep::P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i>, <i>zip::P₃-BS6-sgRNA3-P₃-BS2-mNeonGreen-opt (ery)</i>, <i>cil::P₃-BS3-mTurquoise2-opt-P₃-BS2-sgRNA6 (kan)</i>, <i>bgaA::P_{lac}-dCas9sp (gen)</i></p> <p>Constitutive CAPSULATOR 1.0</p>	This study
VL3882	<p>D39V, <i>AprsI::P_{F6}-lacI (gen)</i>, <i>zip::tmp-P_{lac}-MCS (tmp)</i></p>	Veening lab collection
VL4313	<p>D39V, <i>zip::P₃-BS6-sgRNA3-P₃-BS2-mNeonGreen-opt (ery)</i></p>	This study
VL4315	<p>D39V, <i>zip::P₃-BS6-sgRNA3-P₃-BS2-mNeonGreen-opt (ery)</i>, P_{cps}::<i>tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-cps (tet)</i>, <i>cep::P₃-BS3-sgRNA2 (spc)</i>, <i>bgaA::P_{lac}-dCas9-P₃-BS3-mTurquoise2-opt-P₃-BS2-sgRNA6 (gen)</i></p> <p>CAPSULATOR 2.0</p>	This study
VL4316	<p>D39V, <i>zip::P₃-BS6-sgRNA3-P₃-BS2-mNeonGreen-opt (ery)</i>,</p>	This study

	<i>P_{cps}::tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-Δcps (tet)</i> (NO <i>cps</i>)	
VL4317	D39V, <i>zip</i> :: P ₃ - BS6-sgRNA3- P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt (ery)</i> , <i>P_{cps}::tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-Δcps (tet)</i> (NO <i>cps</i>), <i>cep</i> :: P ₃ -BS3-sgRNA2 (<i>spc</i>)	This study
VL4318	D39V, <i>zip</i> :: P ₃ - BS6-sgRNA3- P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt (ery)</i> , <i>P_{cps}::tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-cps (tet)</i>	This study
VL4319	D39V, <i>zip</i> :: P ₃ - BS6-sgRNA3- P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt (ery)</i> , <i>P_{cps}::tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-cps (tet)</i> , <i>cep</i> :: P ₃ -BS3 (<i>spc</i>) (NO sgRNA2)	This study
VL4320	D39V, <i>zip</i> :: P ₃ - BS6-sgRNA3- P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt (ery)</i> , <i>cep</i> :: P ₃ -BS3-sgRNA2 (<i>spc</i>)	This study
VL4321	D39V, <i>zip</i> :: P ₃ - BS6-sgRNA3- P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt (ery)</i> , <i>P_{cps}::tetM-tetR-P₃-BS6-mScarletI-opt-Δcps (tet)</i> (NO <i>cps</i>), <i>cep</i> :: P ₃ -BS3-sgRNA2 (<i>spc</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} -dCas9-P ₃ -BS3- <i>mTurquoise2-opt-P₃-BS2-sgRNA6 (gen)</i> CAPSU2-Ctl-Delta-cps	This study

VL4322	D39V, <i>zip</i> :: P ₃ - BS6-sgRNA3- P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt (ery)</i> , P _{cps} :: <i>tetM-tetR</i> -P ₃ -BS6- <i>mScarletI-opt-cps (tet)</i> , <i>cep</i> :: P ₃ -BS3 (<i>spc</i>) (NO sgRNA2), <i>bgaA</i> ::P _{lac} -dCas9-P ₃ -BS3- <i>mTurquoise2-opt</i> -P ₃ -BS2-sgRNA6 (<i>gen</i>) CAPSU2-Ctl-Always-OFF	This study
VL4323	D39V, <i>zip</i> :: P ₃ - BS6-sgRNA3- P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt (ery)</i> , P _{cps} :: <i>tetM-tetR</i> -P ₃ -BS1- <i>mScarletI-opt-cps (tet)</i> (NO BS6 but BS1), <i>cep</i> :: P ₃ -BS3-sgRNA2 (<i>spc</i>)	This study
VL4324	D39V, <i>zip</i> :: P ₃ - BS6-sgRNA3-P ₃ -BS2- <i>mNeonGreen-opt (ery)</i> , P _{cps} :: <i>tetM-tetR</i> -P ₃ -BS1- <i>mScarletI-opt-cps (tet)</i> (NO BS6 but BS1), <i>cep</i> ::P ₃ -BS3-sgRNA2 (<i>spc</i>), <i>bgaA</i> ::P _{lac} -dCas9-P ₃ -BS3- <i>mTurquoise2-opt</i> -P ₃ -BS2-sgRNA6 (<i>gen</i>) CAPSU2-Ctl-Always-ON	This study
Plasmid	Genotype	Reference
pVL1305	pPEPX-P ₃ -sgRNA _{luc} , <i>spc</i>	Veening lab collection
pASR102	pPEPZ-P _{lac} , <i>gen</i>	Keller et al
pASR103	pPEPZ-P _{lac} , <i>ery</i> , <i>bla</i>	Keller et al

pASR110	pPEPZ-P _{lac} -mNeonGreen- <i>opt, spc</i>	Veening lab collection
---------	--	------------------------------

References:

1. Slager, J., Aprianto, R. & Veening, J.-W. Deep genome annotation of the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae* D39. *Nucleic Acids Res.* **46**, 9971–9989 (2018).
2. Sorg, R. A., Gally, C., Van Maele, L., Sirard, J.-C. & Veening, J.-W. Synthetic gene-regulatory networks in the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 27608–27619 (2020).
3. Moreno-Gómez, S. *et al.* Quorum sensing integrates environmental cues, cell density and cell history to control bacterial competence. *Nat Commun* **8**, 854 (2017).
4. Liu, X. *et al.* High-throughput CRISPRi phenotyping identifies new essential genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Syst. Biol.* **13**, 931 (2017).