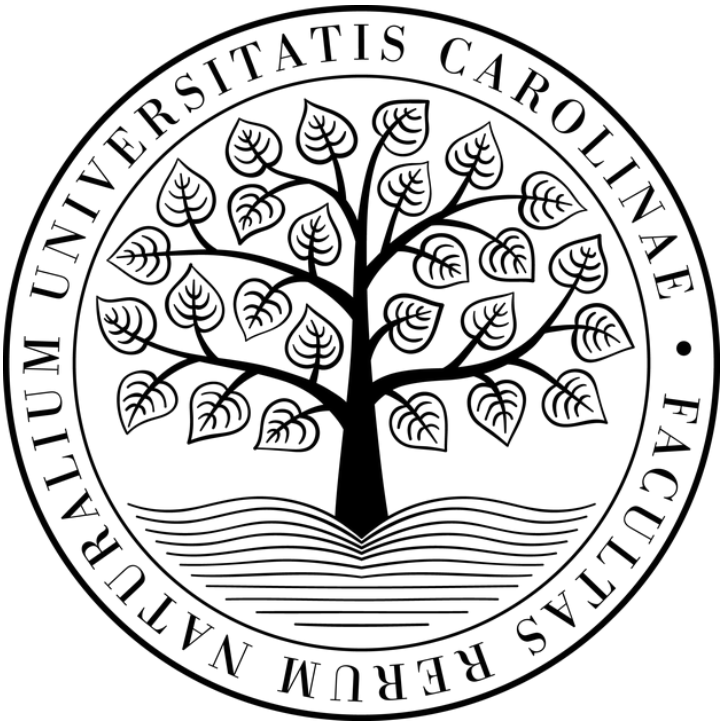
Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta



Diferenciace kvasinkových kolonií: Role vybraných transkripčních faktorů a metabolických proteinů

Differentiation of yeast colonies:
The role of selected transcription factors and metabolic proteins

Mgr. Vítězslav Plocek

Školitelka: prof. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2020

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně a veškeré použité literární zdroje jsou řádně citovány. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla použita pro získání stejného nebo obdobného akademického titulu.

V Praze, dne ……

_____

Abstrakt

Kvasinky, ač se jedná o jednobuněčné mikroorganismy, v přirozených podmínkách vytvářejí složité mnohobuněčné útvary, jako jsou například biofilmy a kolonie. V rámci těchto útvarů následně probíhají děje, jako buněčná diferenciace, specializace jednotlivých buněčných populací a buněčná signalizace, typické pro mnohobuněčné organismy. V literárním úvodu této práce je shrnut přehled současných znalostí o vývoji biofilmů a kolonií, a to především druhu *Saccharomyces cerevisiae*, jako modelovém organismu, a některých vybraných regulací, které jsou důležité pro tvorbu mnohobuněčných struktur. Ve výsledkové části se zaměřuji na dva směry výzkumu. První z nich je směřován na mechanizmy podílející se na tvorbě mnohobuněčných struktur. Při studiu formování SLI biofilmů (biofilmů na rozhraní pevný povrch/kapalina) jsme zdokumentovali antagonistickou roli regulátorů *CYC8* a *TUP1* na jejich utváření a také jsme popsali vliv přítomnosti glukózy na vývoj a stabilitu SLI biofilmů kmene BR-F. Při této příležitosti jsme vyvinuli zobrazovací metodu, díky které jsme schopni za fyziologických podmínek připravit a pomocí mikroskopie pozorovat vnitřní strukturu (svislý průřez) SLI biofilmů i nárůstů neadherovaných buněk. Dále jsme popsali principy distribuce buněk při růstu obřích kolonií a zavedli model distribuce „panter“ pro strukturované kolonie kmene BR-F a model distribuce „zebra“ u hladkých kolonií kmene BY4742. Dále jsme zmapovali osud buněk v průběhu tvorby a vývoje obou typů obřích kolonií.

V druhé části práce jsme se zaměřili na výzkum vlivu mitochondrií, potažmo mitochondriální retrográdní regulace a jejího významu pro diferenciaci hladké kolonie kmene BY4742. Zjistili jsme, že v diferencované kvasinkové kolonii můžeme rozlišit tři způsoby regulace RTG dráhou v závislosti na regulovaných proteinech a také na aktivitě TOR dráhy, a to Ato-větev, Cit2-větev a „viability“ větev RTG regulace, kdy každá z těchto větví reguluje specifické cíle v rozdílné části kolonie. Také jsme identifikovali velké množství nových cílových proteinů RTG dráhy. Kromě klasické regulace, kdy RTG dráha aktivuje expresi vybraných proteinů, jsme popsali i velkou skupinu genů, podílející se na mitochondriální translaci, která je RTG dráhou negativně regulována. Naše výsledky ukazují, že RTG dráha hraje v rámci diferencované kolonie komplexní a důležitou roli v aktivaci vybraných metabolických procesů a v adaptaci a přežívání buněk.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, SLI biofilm, strukturovaná kolonie, hladká kolonie, buněčná diferenciace, FLO11, CYC8, TUP1, RTG dráha

Abstract

Although yeasts are unicellular microorganisms, they form complex multicellular formations such as biofilms and colonies under natural conditions. Within these structures, processes such as cell differentiation, specialization by particular cell populations and cell signalling, which are typical of multicellular organisms, take place. The literature introduction to this thesis summarizes current knowledge regarding the development of biofilms and colonies, in particular those of the model organism, *Saccharomyces cerevisiae*, and some selected regulations that are important for the formation of multicellular structures. In the results section, I focus on two lines of research. The first is directed towards mechanisms, involved in the formation of multicellular structures. In studying the formation of SLI biofilms (biofilms at the solid/liquid interface), we have documented the antagonistic role of the regulators *CYC8* and *TUP1* in their formation and have also described the effect of the presence of glucose on the development and stability of SLI biofilms of strain BR-F. During this study we[D1] have developed an imaging method that allows us to prepare and observe the internal structure (vertical cross-section) of SLI biofilms, as well as the growth of unattached cells, under physiological conditions using microscopy. We have also described the principles of cell distribution during giant colony growth and introduced a "panther" distribution model for structured colonies of strain BR-F and a "zebra" distribution model for smooth colonies of strain BY4742. We also mapped cell fate during the formation and development of both types of giant colonies.

In the second part of the work, we focused on investigating the influence of mitochondria, i.e. mitochondrial retrograde regulation, and its importance for smooth colony differentiation of strain BY4742. We found that in a differentiated yeast colony we can distinguish three modes of RTG pathway regulation, depending on the regulated proteins and also on the activity of the TOR pathway. These are the Ato-branch, the Cit2-branch and the "viability" branch of RTG regulation, and each of these branches regulates specific targets in different parts of the colony. We also identified a large number of novel target proteins of the RTG pathway. In addition to classical regulation, where the RTG pathway activates the expression of selected proteins, we have described a large group of genes involved in mitochondrial translation that are negatively regulated by the RTG pathway. Our results show that the RTG pathway plays a complex and important role in the activation of selected metabolic processes and in cell adaptation and survival within the differentiated colony.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, SLI biofilm, structured colony, smooth colony, cell differentiation, FLO11, CYC8, TUP1, RTG pathway

Seznam zkratek

Zkratka	Anglický význam	Český překlad
AA-RDC	Acetic acid Regulated cell death	Regulovaná buněčná smrt indukovaná kyselinou octovou
CCR	Carbon catabolite repression	Uhlíková katabolická represe
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
ECM	Extracellular matrix	Extracelulární (mezibuněčná) hmota
GFP	Green fluorescent protein	Zelený fluorescenční protein
GM	Glycerol medium	Glycerolové médium
MDR	Multidrug resistance	Mnohočetná léková rezistence
PDC	Programmed cell death	Programovaná buněčná smrt
PKA	Protein kinase A	Proteinkináza A
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
ROS	Reactive oxygen species	Volné kyslíkové radikály
RTG	Mitochondrial retrograde pathway	Mitochondriální retrográdní dráha
SPS	Amino acid sensor system	Senzorový systém aminokyselin
TCA	Tricarboxylic acid cycle	Citrátový (Krebsův) cyklus
TOR	Target of rapamycin	Cíl rapamycinu
TORC1	Target of rapamycin complex 1	Cíl rapamycinu komplexu 1
YCD	Yeast cell death	Regulovaná buněčná smrt u kvasinek
YEG	Yeast Extract Glucose medium	Glukózové médium
SLI	Solid–liquid interface	Rozhraní pevná látka - kapalina

Obsah

Abstrakt....4
Abstract....5
Seznam zkratek....7
1. Úvod....10
2. Cíle práce....11
3. Literární úvod....12
3.1 Mikrobiální mnohobuněčné struktury....12
3.2 Kvasinkové biofilmy....13
3.2.1 Biofilmy *S. cerevisiae*....16
3.3 Kvasinkové kolonie....17
3.3.1 Změna fenotypu kolonie....18
3.3.1.1 Změna fenotypu kolonie přírodních kmenů *S. cerevisiae*....20
3.3.2 Vývoj a diferenciace strukturované kolonie kmene BR-F *S. cerevisiae*....21
3.3.3 Vývoj a alkalizace hladké kolonie *S. cerevisiae* kmene BY4742....25
3.3.4 Diferenciace a sporulace v koloniích *S. cerevisiae*....34
3.4 Regulace důležité pro vývoj kolonií....36
3.4.1 Regulace exprese FLO11....37
3.4.2 Mitochondriální retrográdní signalizace RTG....41
4. Seznam použitých metod....45
5. Výsledky....46
5.1 Glucose, Cyc8p and Tup1p regulate biofilm formation and dispersal in wild *Saccharomyces cerevisiae*....46
5.2 Cell Distribution within Yeast Colonies and Colony Biofilms: How Structure Develops....64
5.3 Divergent branches of mitochondrial signaling to regulate specific genes and viability of specialized cell types of differentiated yeast colonies....78
5.4 Mitochondrial retrograde signaling contributes to metabolic differentiation in yeast colonies...104
6. Diskuse....136
6.1 Mechanismy ovlivňující vývoj mnohobuněčných struktur....136
6.1.1 Tvorba SLI biofilmu na polystyrenu a jeho regulace....136
6.1.2 Odlišnosti vývoje mnohobuněčné struktury určující tvorbu hladké versus strukturované (biofilmové) kolonie....140
6.2 Vliv mitochondriální retrográdní signalizace na vývoj hladkých kolonií....143
6.2.1 Tři větve RTG dráhy a jejich aktivita v buněčných subpopulacích kolonie....143

6.2.2 Identifikace nových cílů RTG dráhy v buněčných subpopulacích kolonie a jejich funkce v metabolismu.....147
6.2.3 Aktivita jednotlivých větví RTG dráhy vzhledem k TORC1 regulaci.....151
7. Závěr.....154
8. Seznam použité literatury.....156

1. Úvod

Kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* byly pro lidstvo vždy nesmírně důležité. Už od pravěku je člověk využívá při výrobě chleba, piva a vína. V modernější době nám tyto mikroorganismy znovu ukázaly svoji důležitost, a to v molekulární biologii, kde jsou modelovým organismem klíčovým pro výzkumu základních procesů probíhajících v jednotlivých eukaryotních buňkách. V laboratorních podmínkách se však často ke kvasinkám přistupovalo a přistupuje jako k jednobuněčným organismům. Avšak v přírodních podmínkách kvasinky vytvářejí převážně složité a vysoce organizované mnohobuněčné struktury, například biofilmy a kolonie. Existence v buněčných komunitách tvořících tyto struktury umožňuje kvasinkám lépe přežívat nepříznivé přírodní podmínky. Navíc tvorba a vývoj těchto struktur vyžadují spuštění procesů, které jsou charakteristické pro mnohobuněčné organismy, a to například buněčné diferenciace a specializace jednotlivých buněčných populací a komunikace mezi buňkami.

Při studiu této problematiky nás nežene pouze touha po vědění. Pochopení základních mechanismů zodpovědných za formování mnohobuněčných struktur je důležité i z medicínského hlediska. Například tvorba biofilmů je významným faktorem virulence pro patogenní kvasinky a zvyšuje jejich rezistenci k léčivům. Dále také byly popsány paralely mezi procesy probíhajícími ve vyvíjející se kvasinkové kolonii a procesy týkajícími se tvorby nádorů.

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo prohloubit naše poznatky o vývoji a diferenciaci mnohobuněčných struktur kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a to se zaměřením především na:

- Objasnění dějů a regulačních mechanismů podílejících se na vývoji struktury SLI biofilmů, strukturovaných (biofilmových) a hladkých kolonií

- Identifikaci mechanismů diferenciace v hladkých koloniích a vlivu stavu mitochondrií v rámci kolonie

- Vyvinutí metod, které nám pomohou lépe popsat vývoj a diferenciaci mnohobuněčných struktur

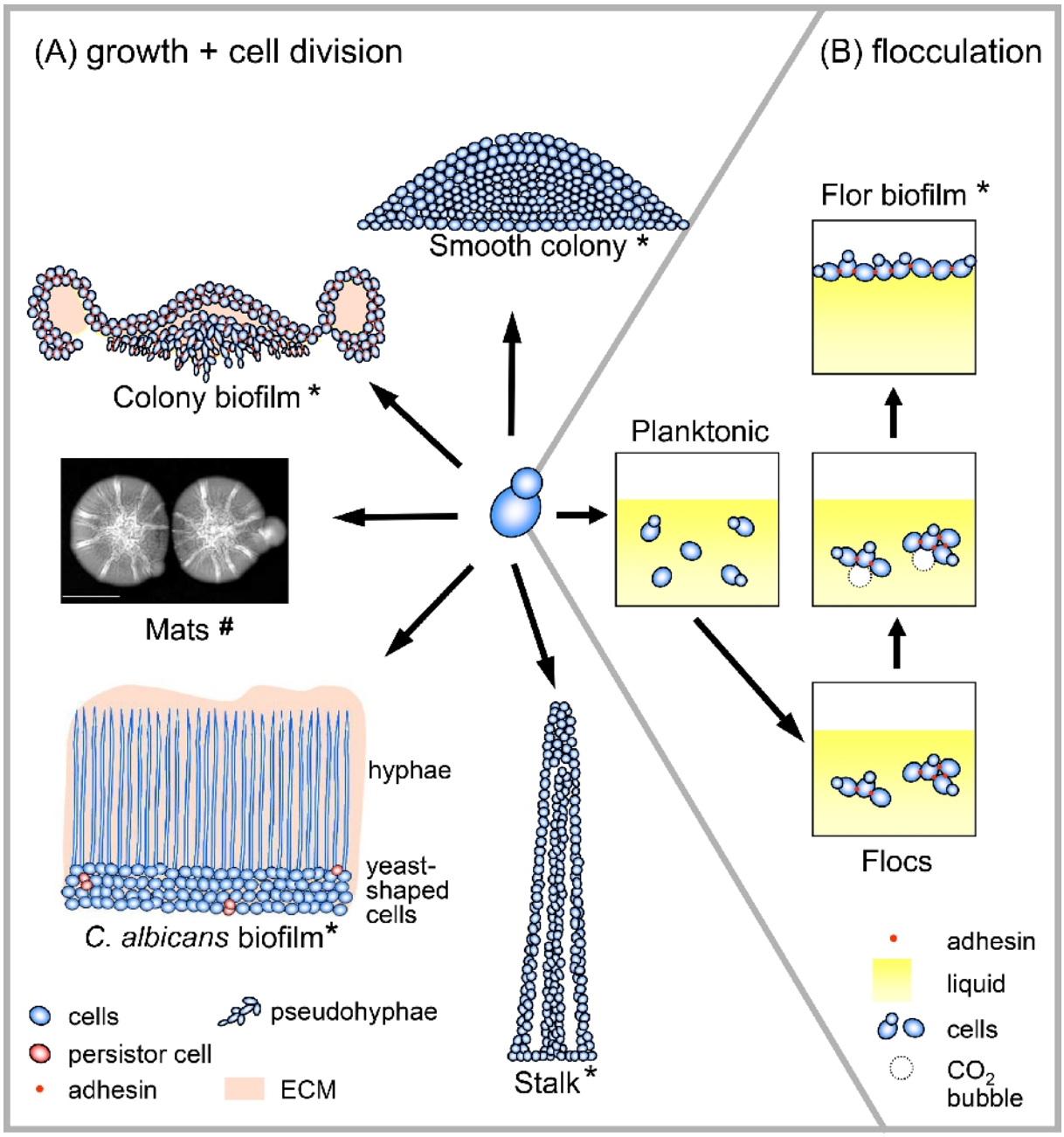
3. Literární úvod

Mikrobiologie byla donedávna vědou jedné buňky a zaměřovala se na její chování většinou za optimálních a stabilních podmínek. Tento přístup je výhodný, pokud je cílem studovat základní mechanismy na úrovni buňky. Nezjistíme tak příliš o podmínkách, ve kterých se mikroorganismy nacházejí a fungují v přírodě. V přirozených podmínkách se musí mikroorganismy často vyrovnávat s mnoha nepříznivými přírodními situacemi pomocí tvorby mnohobuněčných útvarů, jakými jsou například biofilmy a kolonie. Tvorba a vývoj těchto struktur vyžadují spuštění procesů, které jsou charakteristické pro mnohobuněčné organismy, jako jsou buněčná diferenciace a komunikace mezi buňkami. Navíc se často nejedná o jednodruhová společenstva, ale o vícedruhová konsorcia, kde dochází k výměně metabolitů mezi jednotlivými druhy, které díky tomu přežívají. Mnohobuněčný život napomáhá mikroorganismům lépe přežít hladovění, nedostatek vody a jiné nepříznivé podmínky a často pomáhá buňkám odolávat chemikáliím v okolí, například antibiotikům. Studium mikrobiálních komunit je nejvíce zkoumáno na bakteriálních společenstvech, ale důležité je i studium eukaryotních mikrobiálních společenstev (Váchová et al., 2012; Giaouris et al., 2015; Cordero a Datta, 2016). Několik následujících kapitol se bude věnovat představení kvasinkových mnohobuněčných populací, charakterizaci jejich typických rysů a vlastností důležitých pro jejich vývoj a popsat některé regulace, které mohou být klíčové při jejich vývoji. Hlavním cílem této rešerše bude popsat utváření biofilmů a kolonií kvasinek *S. cerevisiae* a některých vybraných mechanismů, které se na jejich vývoji spolupodílejí.

3.1 Mikrobiální mnohobuněčné struktury

Kvasinky, ač se jedná o jednobuněčné mikroorganismy, dokáží vytvořit složité komplexní útvary, ve kterých probíhají diferenciace, signalizace mezi buňkami a tvorba specifických buněčných subpopulací. Základní typy kvasinkových komunit se dají rozdělit mimo jiné i na základě struktury a podmínek, ve kterých se nacházejí. Základními kvasinkovými strukturami jsou floky, flóry, biofilmy, maty, stopky a kolonie. Floky jsou agregáty buněk v tekutých třepaných kulturách. Flóry jsou typy biofilmů nacházející se v tenké vrstvě na rozhraní tekutiny a vzduchu. Biofilmy, v užším smyslu, jsou strukturami, které rostou na rozhraní pevných povrchů (například plastů) a tekutého prostředí. Maty, stopky a kolonie jsou kompaktní struktury, jež rostou na pevném podkladu. Maty jsou povlaky kvasinek, které rostou na plotnách s nízkou koncentrací agaru (0,3 % agaru), jedná se o přechod mezi biofilmy a koloniemi. Stopky jsou útvary s velmi úzkou bází rostoucí do výšky, zatímco kolonie jsou

relativně kompaktnějšími útvary buněk se širší bází (Obrázek 1) (Honigberg, 2011; Váchová a Palková, 2018).



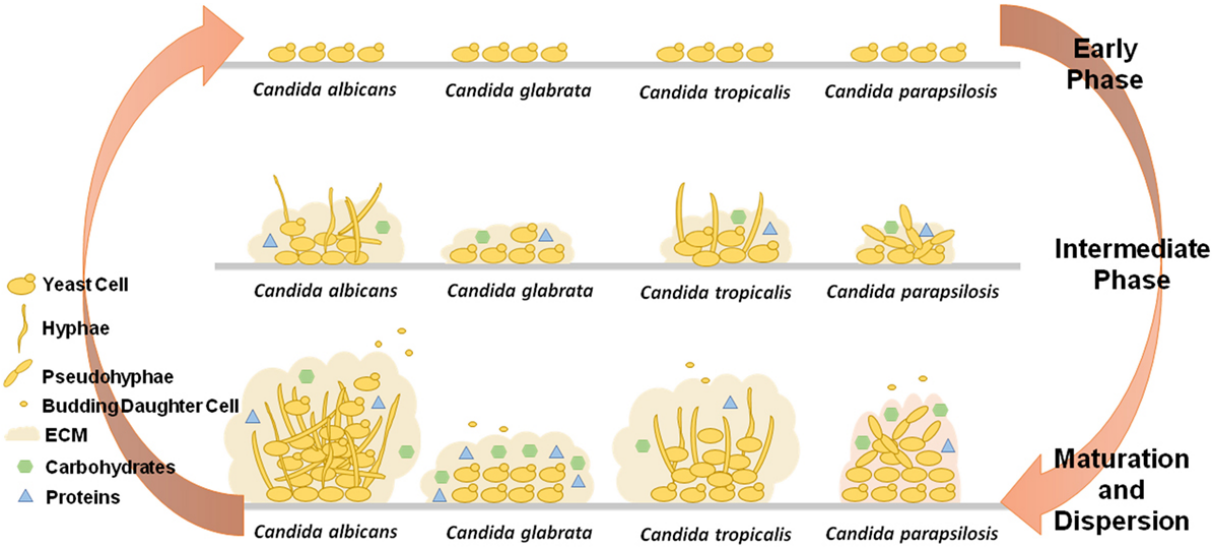
Obrázek 1: Schematické znázornění různých typů mnohobuněčných struktur tvořených kvasinkovými buňkami (Váchová a Palková, 2018).

3.2 Kvasinkové biofilmy

Jako biofilmy bychom mohli označit útvary, které vznikají na rozhraní různých prostředí. Přesně definovat, co to je biofilm, je značně problematické, svým způsobem existuje plynulý přechod od struktur klasických biofilmů, na rozhraní pevného povrchu a tekutiny, přes maty, na rozhraní velmi

řídkého agaru (zhruba 0,3 % agar), po biofilmové kolonie, rostoucí na pevnějším podkladu (2 % agar). Mezi biofilmy se řadí i flóry, které jsou na rozhraní tekutiny a vzduchu (Šťovíček et al., 2010; Váchová a Palková, 2018). V současné době je široce přijímán názor, že pro mnoho mikroorganismů v přírodě je růst v biofilmu přirozenější než růst v suspenzní kultuře, který se hodně využívá při práci s mikroorganismy v laboratoři. V této práci bereme biofilmy jako společenstva buněk na rozhraní vodní a pevné fáze, které jsou pevně adherované k biotickému nebo abiotickému povrchu a které tvoří extracelulární hmotu (ECM) složenou primárně z polysacharidů, jež slouží jako strukturní matrice. Mikroorganismy v biofilmu mají nižší růstovou rychlost, ale zvýšenou odolnost k antimykotikům. V literatuře je věnována velká pozornost bakteriálním biofilmům, hlavně z medicínského hlediska, kdy jejich vyšší odolnost vůči antibiotikům způsobuje větší nebezpečí pro pacienty. Kvasinkové biofilmy však zůstaly upozaděny, i když některé kvasinky jsou nebezpečnými patogeny. Nejvíce studovaným modelem jsou kvasinky rodu *Candida* a především patogenní druh *Candida albicans*, který způsobuje časté povrchové a systémové infekce, jež jsou obtížně léčitelné a mohou vést až k úmrtí pacienta (Nobile a Johnson, 2015; Gulati a Nobile, 2017; Cavalheiro a Teixeira, 2018).

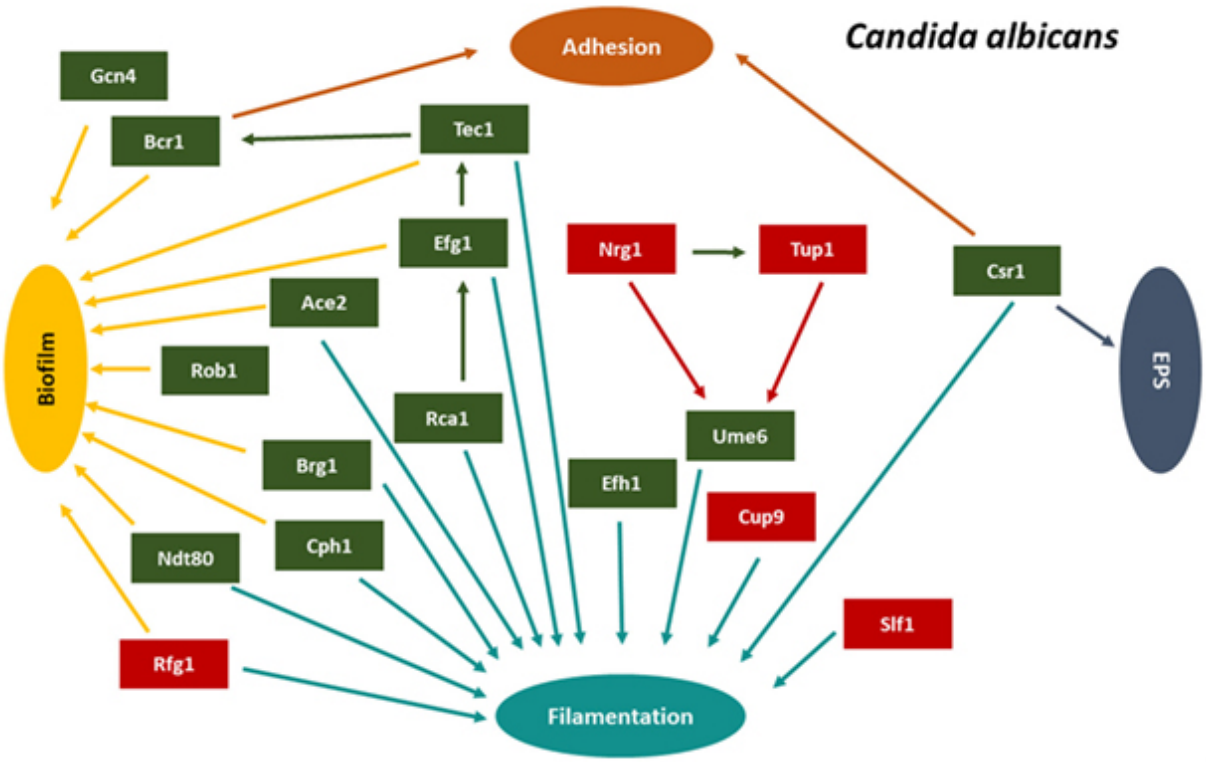
Všeobecně je biofilm dynamickou strukturou, která má tři fáze vývoje (časnou, střední a pozdní), kdy v časné fázi dochází k uchycení buněk, které slouží jako základ biofilmu. Ve střední fázi probíhá diferenciace buněk a tvorba ECM. V pozdní fázi je biofilm plně vyvinutý a dochází k uvolňování buněk do okolí. Průběh jednotlivých fází se může lišit podle druhu kvasinky, materiálu, na kterém rostou, a životních podmínek v okolí, například dostupnosti živin (*Obrázek 2*) (Chandra et al., 2001; Cavalheiro a Teixeira, 2018).



Obrázek 2: Model vývoje biofilmů rodu *Candida* (Cavalheiro a Teixeira, 2018).

Nejlépe je popsán vývoj biofilmu *C. albicans*, který je tvořen třemi typy buněk, a to kulatými kvasinkovými buňkami, pseudohyfami a hyfami. V časné fázi vývoje (zhruba do dvou hodin) dochází k uchycení kulatých kvasinkových buněk (blastospor) k povrchu a růstu mikrokolonií. Ve střední části vývoje biofilmu se mikrokolonie spojují do biofilmu a nastává buněčná diferenciace, kdy se v populaci začínají tvořit hyfy a pseudohyfy. Buňky biofilmu začínají také produkovat ECM. V pozdní fázi dochází k maturaci biofilmu, který je tvořen složitou sítí několika vrstev hyfálních, pseudohyfálních a kvasinkových buněk, obalených ECM. Z plně vyvinutého biofilmu (což trvá zhruba 24 hodin) se následně uvolňují blastospory a celý cyklus se může opakovat. Pro *C. albicans* platí, že v laboratoři tvoří biofilmy na několika různých substrátech a v mnoha různých typech médií, což může ovlivňovat jejich vývoj. Tento model vývoje platí i pro biofilmy tvořené *in vivo* (Chandra et al., 2001; Gulati a Nobile, 2017; Cavalheiro a Teixeira, 2018).

Vývoj biofilmů *C. albicans* řídí rozsáhlá transkripční síť. Pomocí studia deleční knihovny transkripčních faktorů *in vitro* a *in vivo* bylo popsáno šest hlavních regulačních okruhů, které jsou řízeny pomocí šesti hlavních regulátorů (kódovaná geny *EFG1*, *TEC1*, *BCR1*, *NDT80*, *BRG1* a *ROB1*) (Nobile et al., 2012), nezbytných pro vývoj biofilmu (Obrázek 3).



Obrázek 3: Schéma transkripční regulační sítě řídící růst a vývoj biofilmu *C. albicans* – aktivátory jsou zeleně a represory červeně (Cavalheiro a Teixeira, 2018).

Klíčovým krokem při vývoji biofilmu je uchycení buněk k biotickému nebo abiotickému podkladu, hlavním pozitivním regulátorem adheze je Bcr1p (Nobile a Mitchell, 2005). Kromě něj se se tohoto kroku účastní i další regulátory, a to Snf5p přes regulaci Ace2p (Finkel et al., 2012). Cílovými proteiny regulace pomocí Bcr1p jsou především adheziny *ALS* rodiny (sekvence podobná aglutininu), například Als1p, Als3p, nebo *HWP* rodiny (protein hyfové stěny), jako Hwp1p (Nobile et al., 2006; de Groot et al., 2013).

Dalším krokem vývoje biofilmu je buněčná diferenciace a tvorba hyf. Ty přispívají v biofilmech k celkové architektonické stabilitě biofilmu a fungují jako podpůrné lešení. Jejich tvorba je regulována transkripčními faktory Efg1p, Tec1p Ndt80p a Rob1p (Nobile et al., 2012; Ramage et al., 2012).

Důležitou součástí biofilmu je ECM, která se u *C. albicans* skládá hlavně ze 40 % sacharidů (z toho je 32 % glukóza), 5 % proteinů, 3,3 % hexosaminů a 0,5 % kyseliny uronové (Baillie a Douglas, 2000; Al-Fattani a Douglas, 2006). Tvorba ECM je regulována pomocí Csr1p, která negativně kontroluje koncentraci β-1,3-glukanu přítomného v ECM (Nobile et al., 2009).

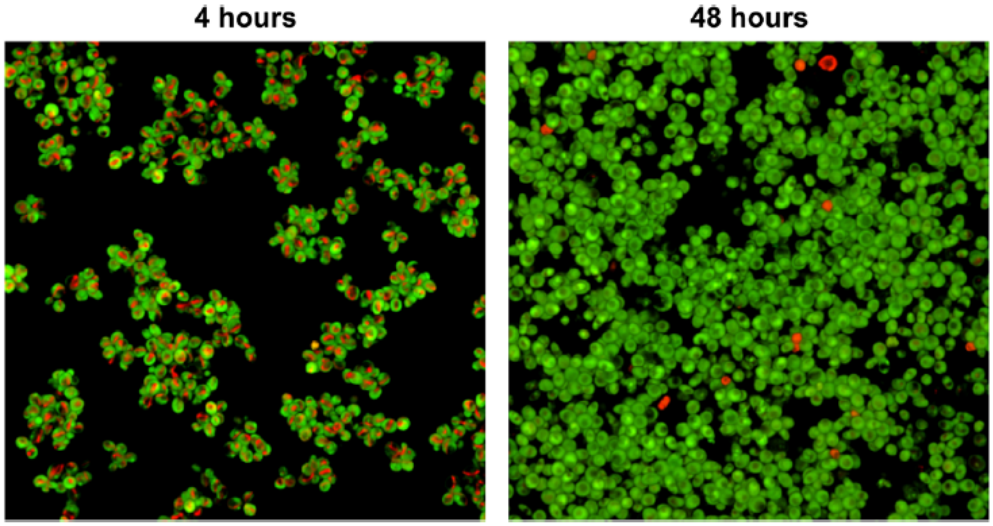
Poslední fází vývoje biofilmu je disperze, během níž buňky uvolněné z biofilmu mají oproti buňkám z třepaných kultur zvýšenou adhezi a schopnost tvořit biofilmy. Uvolňování buněk je regulováno pomocí regulátorů Ume6p, Pes1p a Nrg1p, kdy nadprodukce Ume6p má za následek snížení počtu uvolňovaných buněk, zatímco nadprodukce Pes1p nebo Nrg1p zvyšuje množství uvolňovaných buněk (Uppuluri et al., 2010a; Uppuluri et al., 2010b).

3.2.1 Biofilmy *S. cerevisiae*

Na rozdíl od biofilmů *C. albicans*, o biofilmech *S. cerevisiae* je toho známo relativně málo. Bylo prokázáno, že buňky *S. cerevisiae* dokáží adherovat k plastům (jako jsou polypropylen a polyvinylchlorid) a také že snížená koncentrace glukózy zvyšuje adhezi buněk. Zároveň tato adheze je závislá na proteinu Flo11p a při jeho deleci nedochází k uchycení buněk (Reynolds a Fink, 2001). Regulace adheze přes Flo11p v biofilmech může být realizována přes proteinkinázu A Tpk3p (Andersen et al., 2014) (více o regulaci *FLO11* při vývoji biofilmů v kapitole 3.4.1). Tyto zjištění prokázali, že u kmene Σ1278b *S. cerevisiae* a u kmenů od něho odvozených může dojít k první fázi vývoje biofilmů (Reynolds a Fink, 2001). Během vývoje biofilmu dochází také ke změnám v metabolické aktivitě buněk. Použitím barvení pomocí FUN-1, kde dochází k barvení vakuoly metabolicky aktivních buněk, bylo zjištěno, že buňky v mladém – 4 hodiny starém – biofilmu jsou výrazně více metabolicky aktivní než v maturovaném, 48 hodin starém, biofilmu (Obrázek 4). Dále se zjistilo, že pouze rostoucí buňky z mladého biofilmu jsou citlivé k fungistatickým léčivům jako voriconazole (VOR) či flucytosine (5FC) a jsou usmrceny pomocí caspofunginu (CAS). Pouze

amphotericin B (AmB) je účinný v zabíjení mladých i maturovaných biofilmů kmene Σ1278b *S. cerevisiae*. To ukazuje, že v tomto případě rezistence k antimykotikům v biofilmu je spíše způsobená větším množstvím stacionárních buněk (Bojsen et al., 2014).

Studie na biofilmech ukázaly důležitost quorum sensing molekul. Tvorba biofilmu může být regulována pomocí aromatických alkoholů (fenylethanol a tryptofol), které fungují jako quorum sensing signál indukující filamentární růst přes *TPK2* dráhu a Flo11p. Tato signalizace je také ovlivněná amoniakem, kdy jeho vysoká koncentrace regulaci reprimuje (Chen a Fink, 2006). Dalším quorum sensing signálem, který indukuje tvorbu biofilmu a urychluje jeho tvorbu, je oxid dusnatý (NO). Pomocí transkripční a proteomické analýzy bylo zjištěno, že důležitým regulátorem v této signalizaci je transkripční faktor Mac1p, regulující geny *CTR1*, *CTR3*, *FRE1*, *FRE7*, *IRC7* a *REE1*. Tato regulace se navíc zdá nezávislá na *FLO11*, protože zvýšení nebo snížení úrovně exprese Mac1p nemá vliv na expresi Flo11p (Yang et al., 2019). Další informace o formování biofilmů byly získány studiem biofilmům příbuzným struktur, jako jsou maty a strukturované kolonie (více v kapitole 3.3.2).

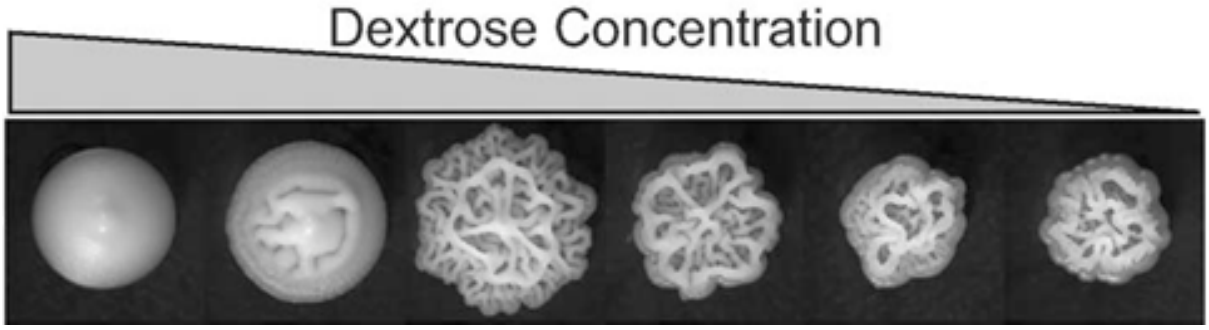


Obrázek 4: Buňky 4 hodiny a 48 hodin starých biofilmů *S. cerevisiae* barvené FUN-1 (10µM), metabolicky aktivní buňky tvoří červené vakuolární struktury (Bojsen et al., 2014).

3.3 Kvasinkové kolonie

Kvasinková kolonie je mnohobuněčná struktura tvořená buňkami rostoucími na pevném živném médiu. Kolonie mohou vznikat z jedné buňky (takzvané mikrokolonie), popřípadě z kapky buněčné suspenze (takzvané obří kolonie). Kolonie nám poskytují vhodný model pro studium mikrobiální mnohobuněčnosti.

Tvar a struktura kvasinkové kolonie jsou proměnlivé a závislé na životních podmínkách (např. zdroji živin), ve kterých kolonie rostou. Fenotyp kolonií je přímo závislý na vnějších jevech (Obrázek 5) (Granek a Magwene, 2010), avšak u kvasinek dochází také k jevu zvanému přepínání fenotypu, kdy při daných vnějších podmínkách kvasinky s určitou pravděpodobností dokáží měnit rychle a reverzibilně jak strukturu kolonie tak morfologické a fyziologické vlastnosti buněk. Přepínání fenotypu je epigenetické a nedochází při něm ke změnám genotypu. Jedná se o proces, díky kterému může populace flexibilně reagovat na změny prostředí (Van Der Woude, 2006; Xie et al., 2013; Šťovíček et al., 2014).



Obrázek 5: Změna fenotypu kolonie kmene YJM311 *S. cerevisiae* v závislosti na koncentraci dextrózy v médiu (od 2% do 1/16%) (Granek a Magwene, 2010).

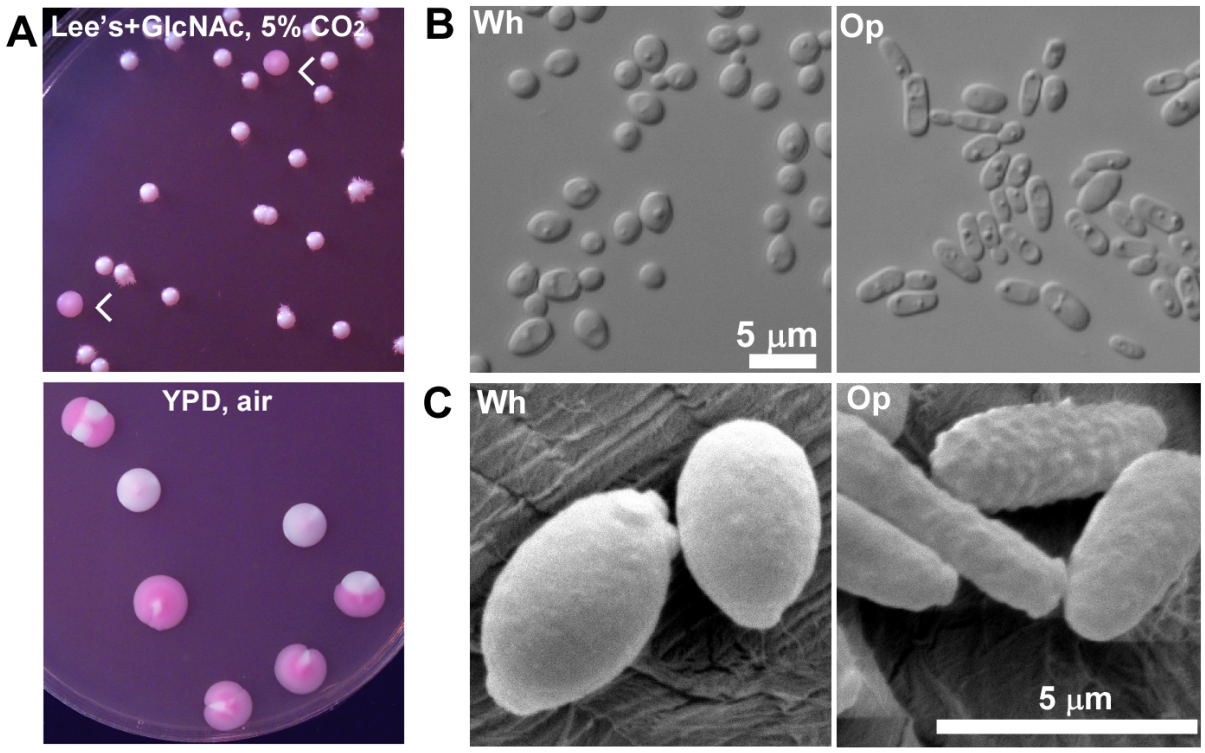
3.3.1 Změna fenotypu kolonie

Přepínání fenotypu není typické jen pro patogenní kvasinky, u kterých je důležité při virulenci a adaptaci na hostitele, jako například *Candida albicans* (Xie et al., 2013), *Candida auris* (Bentz et al., 2019), *Candida glabrata* (Lachke et al., 2002) a *Trichosporon asahii* (Ichikawa et al., 2016), ale i pro nepatogenní druhy – jako například *Torulaspora microellipsoides* (Brimacombe et al., 2020) a především člověkem nejvíce využívaná *Saccharomyces cerevisiae* (Kuthan et al., 2003; Šťovíček et al., 2010).

Nejlépe zdokumentované přepínání je mezi „opaque“ a „white“ fenotypem u patogenní kvasinky *C. albicans*. Tyto dva stavy se liší v mnoha aspektech – v morfologii buněk, virulenci a schopnosti párování (Beekman et al., 2021). *C. albicans* „white“ fenotyp tvoří na agarových plotnách kopulovité bílé kolonie, složené z menších oválných kvasinkových buněk. Spontánně a reverzibilně se však dokáže přepnout do „opaque“ fenotypu, kdy vytváří plošší kolonie, které mají tmavou matnou barvu a jsou tvořeny většími podlouhlými buňkami (Obrázek 6) (Xie et al., 2013).

Kromě morfologie buněk se tyto dva stavy liší ve virulenci, v adhezivitě kolonie k podkladu a ovlivnění invazivního růstu, což hraje důležitou roli v adaptaci na hostitele této patogenní kvasinky. „White“ buňky jsou více virulentní při systematických infekcích, zatímco „opaque“ buňky jsou více

vhodné pro kolonizaci kůže (Lachke et al., 2002; Takagi et al., 2019). Dále také je rozdíl v reakci imunitního systému, kdy se „white“ forma lépe vyhýbá imunitnímu systému hostitele, což pomáhá při kolonizaci vnitřního prostředí. Důležitým mechanismem obrany před imunitním systémem je pseudohyfální růst, díky kterému buňky unikají z makrofágů (Lorenz et al., 2004). Podmínky, při kterých dochází u „white“ buněk k růstu hyf, jsou například neutrální pH, 37 °C, nedostatek živin a CO_2. Pro „opaque“ buňky je naopak optimální teplota 25 °C, zatímco vyšší teplota inhibuje pseudohyfální růst (Beekman et al., 2021; Si et al., 2013). Rozdíly jsou také v metabolismu jednotlivých populací, kdy „white“ buňky jsou lépe přizpůsobeny širokému spektru podmínek, zatímco „opaque“ buňky vycházejí z analýz spíše jako metabolicky specializovaná forma (Ene et al., 2016).

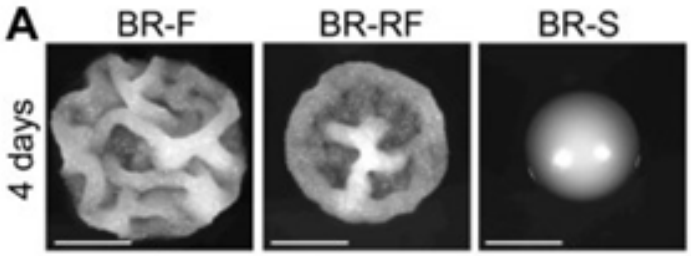


Obrázek 6: Přepínání fenotypu *„white“* a *„opaque“* při růstu na misce (A) a rozdíly mezi fenotypem buněk *„white“* (B) a *„opaque“* (B) *C. albicans* (Xie et al., 2013).

Dalším rozdílem mezi oběma fenotypy je schopnost párování, kdy „opaque“ buňky párují s milionkrát větší efektivitou než „white“ buňky (Miller a Johnson, 2002). Hlavním regulátorem white-opaque přepínání fenotypu je protein Wor1p Pro fenotypové přepnutí není nutné, aby kmeny byly homozygotní v párovacím typu (MTLa/a nebo MTLα/α), i když to bývá častější, kmeny mohou být i heterozygotní (MTLa/α) Komparativní analýza celého genomu nezjistila žádné změny spojené s přepínáním fenotypu, což ukazuje, že přepínání fenotypu je závislé na epigenetické regulaci, a ne na genetické variaci (Beekman et al., 2021).

3.3.1.1 Změna fenotypu kolonie přírodních kmenů *S. cerevisiae*

U kvasinek *S. cerevisiae* lze pozorovat dva odlišné fenotypy růstu kolonií. Kmeny izolované z přírody často tvoří komplexní strukturované kolonie („fluffy" – F), zatímco laboratorní kmeny spíše tvoří méně strukturované hladké kolonie („smooth" – S). Přepínání fenotypu mezi těmito dvěma typy kolonií lze pozorovat u přírodních kmenů, které v laboratorních podmínkách při růstu na bohatém médiu (například glycerolovém GM médiu) mají tendenci přepínat fenotyp na hladký typ kolonie (Obrázek 7) (Kuthan *et al.*, 2003; Šťovíček et al., 2010). Tato změna fenotypu není spojena se změnami genotypu a je vratná („re-fluffy" – RF), avšak pro návrat je potřeba kmeny dlouhodobě vystavit hladovění a stresujícím podmínkám (Šťovíček et al., 2014). Tomuto chování se říká domestikace mikroorganismů, kdy při kultivací sociálních mikroorganismů ve stabilních podmínkách může nastat ztráta jejich sociálního chování (Velicer et al., 1998).

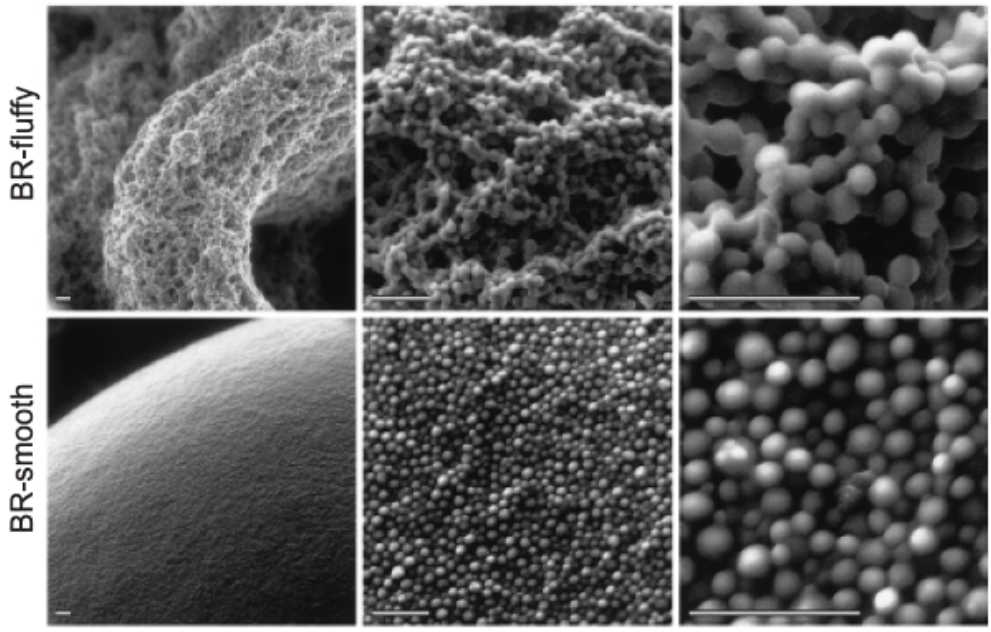


Obrázek 7: Rozdíly v morfologii mezi fenotypy kolonií strukturovaných (BR-F a BR-RF) a hladkých (BR-S) u divokého kmene *S. cerevisiae* (Šťovíček et al., 2014).

Hlavním rozdílem mezi hladkou a strukturovanou kolonií je přítomnost extracelulární matrix (ECM) ve strukturované kolonii (Obrázek 8). Jako hlavní složka ECM byl identifikován přes 200 kDa velký nespecifikovaný glykoprotein (Kuthan et al., 2003). Rozdíly jsou také ve velikosti kolonií. Strukturovaná kolonie má zhruba třikrát více biomasy než stejně stará hladká kolonie téhož kmene, avšak v hladké kolonii je větší množství buněk. Mění se také morfologie buněk, kdy se z převážně protáhlých buněk ve strukturované kolonii stávají oválné buňky v hladké kolonii. Během přepnutí fenotypu dochází k velkým změnám, ve strukturovaných koloniích, kdy je zvýšená exprese proteinů metabolismu sacharidů, proteinů účastnících se glykosylace, aquaporiny, TY transpozony a metabolismu vitamínů, zatímco v hladkých koloniích dochází ke změnám u proteinů buněčné stěny, transportérů, stresové odpovědi, v translaci, transkripci, polaritě a buněčném cyklu (Kuthan et al., 2003; Šťovíček et al., 2010; Šťovíček et al., 2014).

Klíčovou roli při tvorbě strukturované kolonie hraje adhezin Flo11p, který je také nutný pro prodlužování buněk organizovaných do radiálních shluků a pseudohyfální expanzi (Vopálenská et al., 2010), zároveň delece genu *FLO11* u divokých kmenů *S. cerevisiae* vede ke změně na hladkou

morfologii kolonie (Šťovíček et al., 2010) a při přepnutí fenotypu ze strukturované na hladkou kolonii (z BR-F na BR-S) dochází k výrazné redukci exprese Flo11p, i když i v hladké kolonii je Flo11p exprimován (Šťovíček et al., 2014). Více o regulaci Flo11p v kapitole 3.4.1.

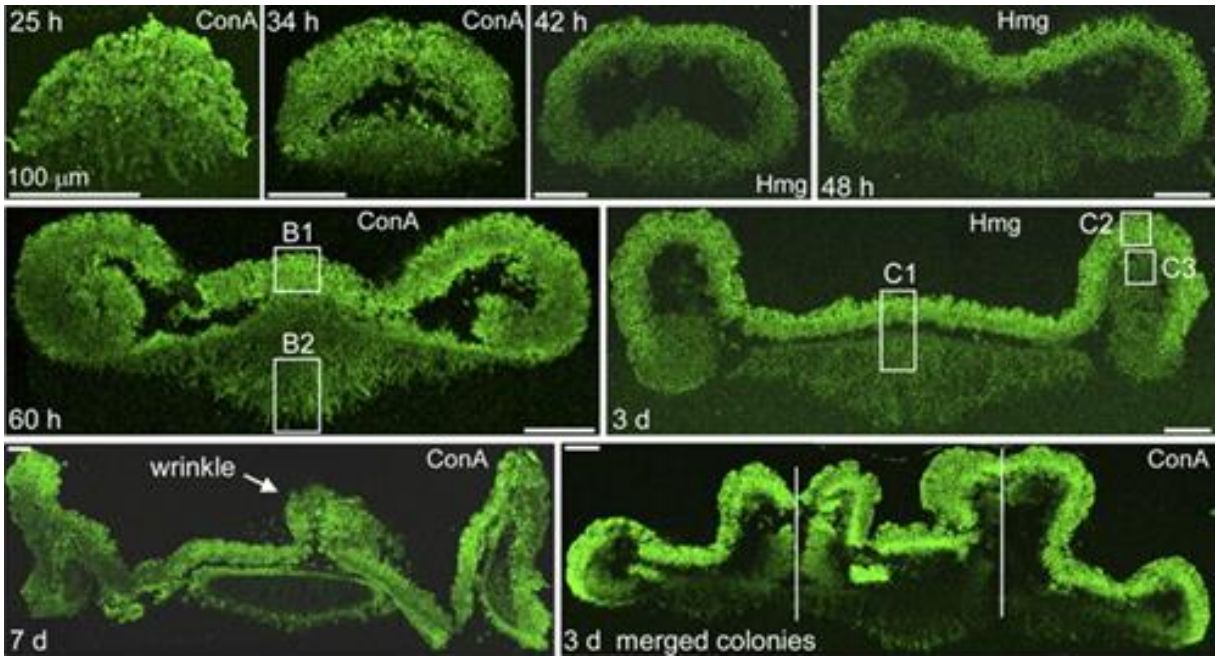


Obrázek 8: Mikroskopické ultrastruktury strukturované kolonie BR-F a hladké kolonie BR-S pozorované pomocí environmentální rastrovací elektronové mikroskopie a rozdíly v přítomnosti ECM mezi nimi (Kuthan et al., 2003).

3.3.2 Vývoj a diferenciace strukturované kolonie kmene BR-F *S. cerevisiae*

Strukturované kolonie jsou velmi podobné biofilmům hub, proto jsou také někdy označované jako biofilmové kolonie (Šťovíček et al., 2010). Při studiu vývoje struktur strukturovaných (biofilmových) kolonií *S. cerevisiae* byl použit divoký kmen BR-F (původně izolovaný z přírody) ze sbírky Chemického ústavu Slovenské akademie věd v Bratislavě (Kuthan et al., 2003). První den vývoje se tvoří malá bochánkovitá kolonie, složená převážně ze zaoblených buněk a na spodní části s krátkými pseudohyfami, které začínají zarůstat do agaru. Během druhého dne se nejprve objevuje uprostřed kolonie kavita a následně se kolonie začíná rozrůstat hlavně do stran, přičemž se na okrajích kolonie tvoří hřeben. Ve střední části kolonie se tvoří kořenové pseudohyfy, které jsou zarostlé v agaru. Během třetího dne se střední část vodorovně rozšiřuje a dochází k vyzvednutí okrajového hřebene do výšky, čímž kolonie získává tvar misky. Ze základny hřebene navíc začnou zarůstat do agaru sekundární kořínky. Další pokračování růstu centrální buněčné vrstvy má za následek její zvlnění a tvorbu vrásek (Obrázek 9). Kolonii můžeme rozdělit na dvě hlavní části, a to

vzdušnou část, nad agarem, která je tvořena oválnými buňkami, a kořínkovou část, zarostlou v agaru, která se skládá z pseudohyf (Váchová et al., 2011).



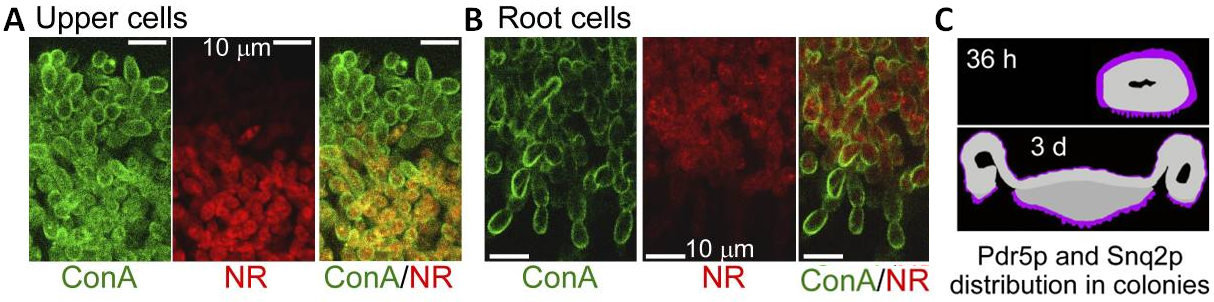
Obrázek 9: Vývoj strukturované kolonie kmene BR-F *S. cerevisiae* v prvních třech dnech. Buňky jsou označeny pomocí ConA nebo Hmg1p-GFP (Váchová et al., 2011).

K identifikaci růstových fází jednotlivých buněčných subpopulací byly použity kmeny se značeným Hmg1p-GFP, který je lokalizovaný v jaderné membráně, a cdc3^{ts}, obsahující teplotně citlivou mutaci genu *CDC3* pro septin. Díky tomu se podařilo rozlišit jednotlivé subpopulace dělících se, časně stacionárních, stacionárních a mladých nedělících se buněk. Zajímavé je, že stacionární buňky jsou v pozdějších fázích vývoje lokalizované na povrchu kolonie, zatímco dělící se buňky jsou uvnitř a v okrajových částech kořínků (Obrázek 10) (Váchová et al., 2011).

Obrázek 10: Model diferenciace na jednotlivé buněčné subpopulace při vývoji kolonie BR-F *S. cerevisiae*: dělící se buňky (zelená), časné stacionární buňky (žlutá), stacionární buňky (červená) a mladé nedělící se buňky (modrá) (Váchová et al., 2011).

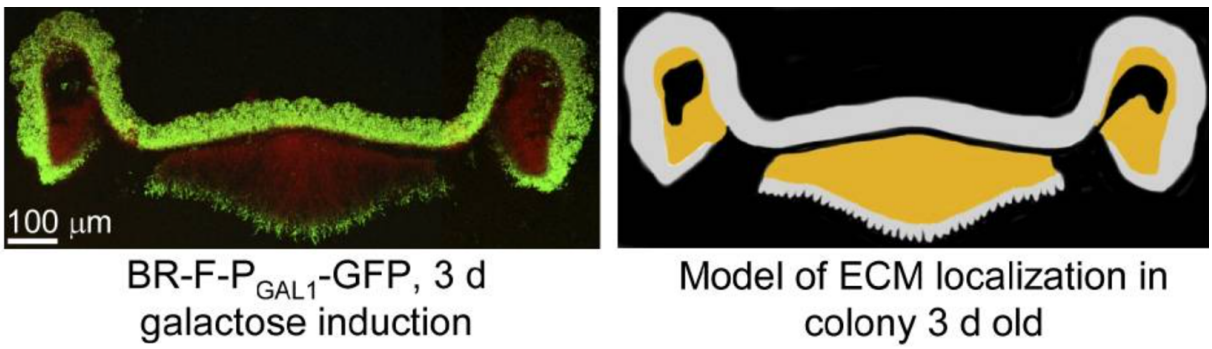
Kromě rozdělení podle růstové fáze nebo morfologie buněk bylo rovněž zjištěno, že povrch biofilmové kolonie je chráněn pomocí speciální vrstvy buněk. Při barvení membrán a lipidických

granulí pomocí barvy Nile Red (NR) nedošlo k jejich obarvení, avšak barvení buněčné stěny pomocí Concavalinu s navázanou fluorescenční sondou Alexa Fluor 488 fungovalo (ConA). Při fixaci buněk a použití NaN_3, způsobujícím vyčerpání ATP buňkami, barvení pomocí NR fungovalo – což naznačuje, že buňky na povrchu se aktivně zbavují NR. Delecí různých pump mnohočetné lékové resistence (MDR) se zjistilo, že pro export NR v povrchové vrstvě jsou nezbytné transportéry Pdr5p a Snq2p, které by mohly být regulovány pomocí transkripčního faktoru Pdr1p. Tato ochranná vrstva se nachází jak na vzdušné, tak na kořínkové části kolonie (Obrázek 11) (Váchová et al., 2011).



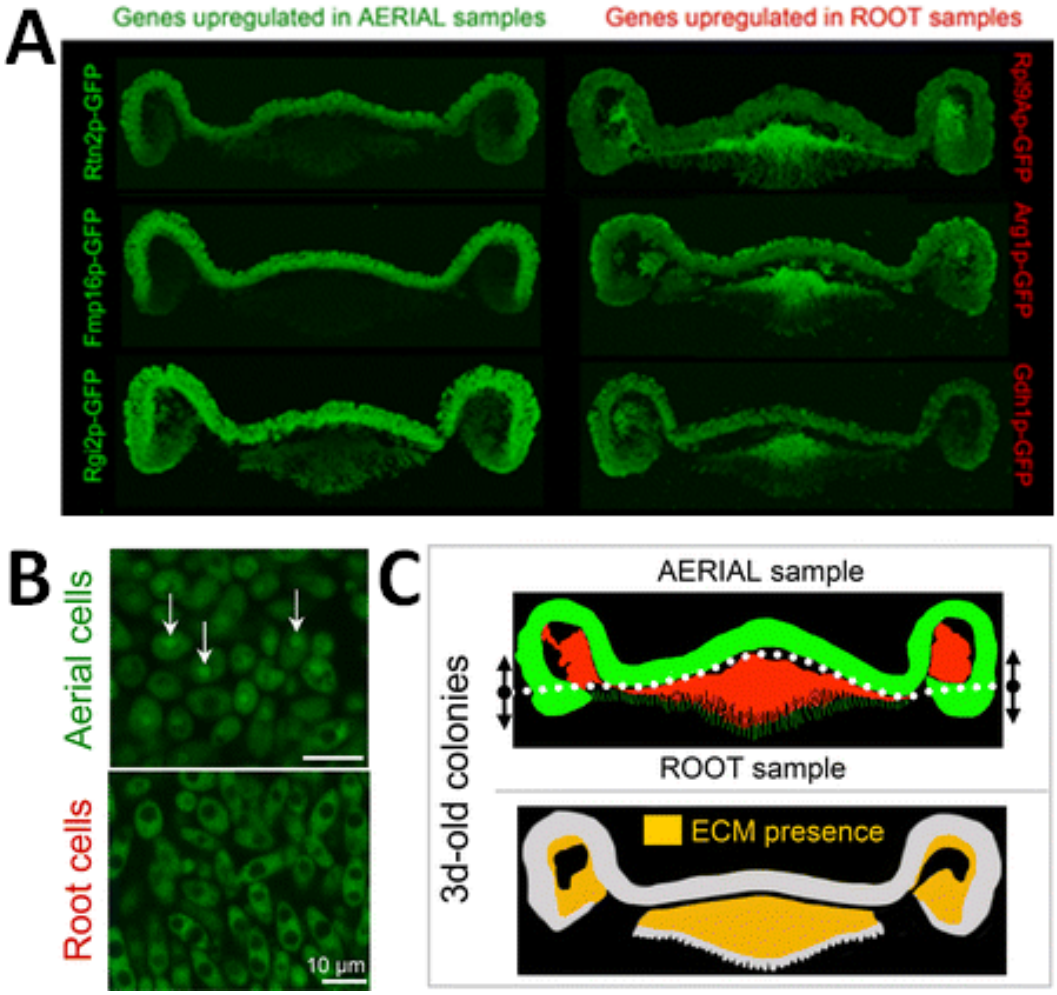
Obrázek 11: Lokalizace aktivních MDR transportérů v kolonii. Barvení buněk pomocí ConA a NR v horních buňkách (A), kořínci (B) a model distribuce ochranné vrstvy v kolonii (C) (převzato a upraveno z Váchová et al., 2011).

Jak už bylo zmíněno dříve, důležitým znakem biofilmových kolonií oproti hladkým *S. cerevisiae* je tvorba ECM (Kuthan et al., 2003). Studiem kolonií kmene, který obsahoval gen GFP pod indukčním promotorem (galaktózovým nebo měďnatým), bylo pozorováno, že indukce z média spouští expresi GFP pouze v povrchových částech kolonie a střed kolonie zůstává bez signálu. To by mohlo být vysvětleno tvorbou ECM, která zabraňuje proniknutí induktoru do středu kolonie. Tato oblast ECM se objevuje u mladých kolonií mezi 33. a 35. hodinou růstu a zvětšuje se v závislosti na růstu kolonie (Obrázek 12) (Váchová et al., 2011).



Obrázek 12: A) Indukce GFP pomocí galaktózového promotoru (zelená – GFP signal, červená – autofluorescence buněk); B) model lokalizace ECM ve 3 dny staré kolonii (převzato a upraveno z Váchová et al., 2011).

Hlubší vhled do diferenciace biofilmových kolonií byl získán pomocí sekvenace RNA. Mikrokolonie je možno rozdělit na vzdušnou část nad agarem a kořínkovou část, která zarůstá. V tomto případě je pro správné rozdělení obou částí potřeba ke kultivaci použít filtr položený na agar, přes který dokáže kolonie prorůstat do média, ale toto uspořádání neovlivní vývoj biofilmové kolonie. Při porovnání výsledků jednotlivých subpopulací se ukázalo, že ve vzdušné části kolonie je výrazně zvýšená exprese skupin genů podílejících se na meióze a sporulaci, stresové odpovědi a degradaci proteinů (a to především autofagii a ubiquitinaci). V kořínkové části kolonie byla výrazně zvýšená hladina RNA pro skupiny podílející se na biogenezi ribozomů a jejich struktuře, translaci a biosyntéze aminokyselin a purinů/pyrimidinů. To naznačuje, že kořínkové buňky aktivují svůj metabolismus, zatímco buňky ve vzdušné části mění svůj metabolismus tak, aby se vyrovnaly s různými stresovými podmínkami a hladověním (Obrázek 13) (Maršíková et al., 2017).

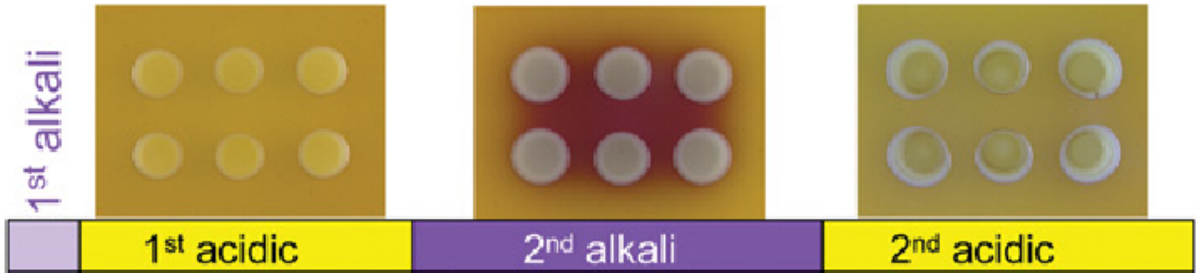


Obrázek 13: A) rozdíly v morfologii buněk ve vzdušné a kořínkové části; B) exprese vybraných proteinů značených pomocí GFP se zvýšenou expresí ve vzdušné a nebo kořínkové části; C) model ukazující rozdělení biofilmové kolonie na vzdušnou a kořínkovou část (převzato a upraveno z Maršíková et al., 2017).

Analýza vybraných proteinů, značených pomocí GFP, které mají zvýšenou expresi v kořenové nebo vzdušné části, dále ukázala, že buňky, jež specificky produkují proteiny typické pro vzdušné části kolonie, se kromě povrchu kolonie také nacházejí na malé části špičky kořínků vrůstajících do agaru a buňky, které tvoří proteiny typické pro kořenovou část kolonie, se kromě ní nacházejí i v dutinách vzdušné části kolonie (Obrázek 13) (Maršíková et al., 2017).

3.3.3 Vývoj a alkalizace hladké kolonie *S. cerevisiae* kmene BY4742

Během růstu na nefermentovatelném zdroji uhlíku (nejlépe je zdokumentován růst na glycerolovém médiu) dochází k fyziologickým změnám během vývoje kolonií, doprovázeným změnou okolního pH, jež se dá sledovat pomocí pH indikátoru v médiu. Dochází k pravidelnému střídání acidické fáze růstu, při níž je pH média kolem 5, s fází alkalickou, kdy dochází ke zvýšení okolního pH na hodnoty kolem 7 (Obrázek 14). Zároveň během přechodu z acidické do alkalické fáze začínají kolonie produkovat a uvolňovat plynný amoniak. Toto chování bylo popsáno u různých druhů kvasinek, například u *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida mogii*, *Kluyveromyces lactis* a dalších (Palková et al., 1997).

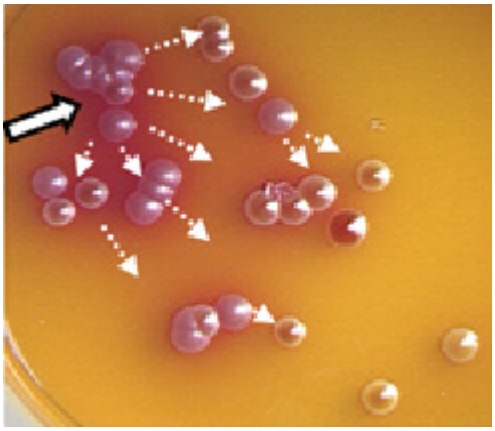


Obrázek 14: Vývoj obřích kolonií laboratorního kmene BY4742 *S. cerevisiae* na glycerolovém médiu s pH indikátorem (Váchová a Palková, 2011).

Produkovaný amoniak funguje jako signální molekula působící na dlouhou vzdálenost, jež indukuje přechod z acidické do alkalické fáze růstu, pomocí něhož kolonie dokáží synchronizovat svůj vývoj (Obrázek 15). Zároveň dochází k asymetrickému růstu kolonií směrem od signálu. Těchto změn je možno dosáhnout i umělým zdrojem amoniaku. Amoniaková signalizace je univerzální a funguje i mezi koloniemi různých rodů kvasinek (Palková a Forstová, 2000). Produkce amoniaku v koloniích je nezávislá na jeho vnějším zdroji, avšak závisí na přítomnosti některých aminokyselin v médiu a přítomnosti transportérů aminokyselin (Zikánová et al., 2002).

Jako model ke studiu vývoje hladkých kolonií *S. cerevisiae* slouží laboratorní kmen BY4742 (Palková a Forstová, 2000; Váchová a Palková, 2018). Při microarray analýze exprese genů ve vyvíjející se obří kolonii byly identifikovány geny, u kterých dochází k velkým změnám hladiny mRNA

transkriptu při přechodu z acidické do alkalické fáze. Při alkalizaci dochází k rozsáhlým adaptivním změnám metabolismu kolonie. Především se jedná o represi genů souvisejících s oxidačním katabolismem a funkcí mitochondrií, aktivaci genů podílejících se na beta oxidaci mastných kyselin, peroxizomální syntéze acetylCoA a vzniku peroxizomů. Dochází také ke změnám v expresi transportérů, a to represi hexozových *HXT* a aktivaci fosfátových, sirných a zinkových transportérů, ke změnám v aminokyselinovém metabolismu. Rovněž dochází k represi genů stresové odpovědi (Palková et al., 2002).



Obrázek 15: Kvasinkové mikrokolonie synchronizují svůj vývoj. Kolonie produkující NH_3 (černě ohraničená šipka) indukuje ostatní kolonie v okolí (Váchová a Palková, 2011).

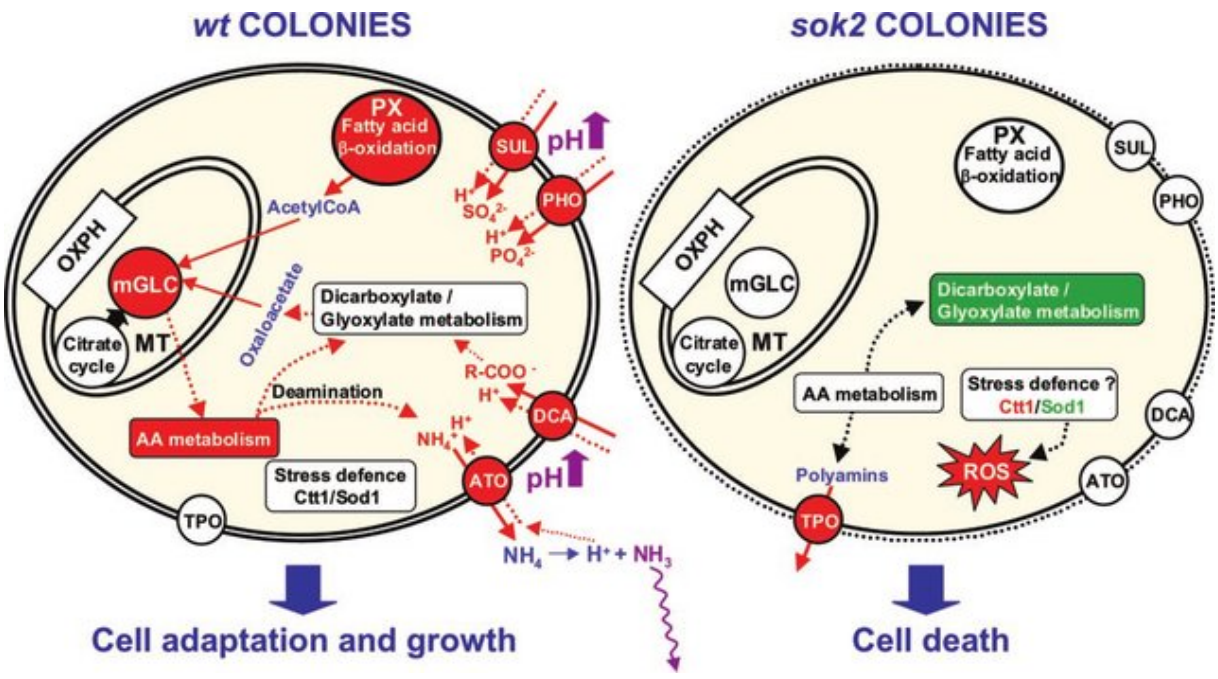
Při přechodu kolonie z acidické do alkalické fáze růstu dochází také k rychlé a silné expresi Ato proteinů (Palková et al., 2002). *ATO1*, *ATO2* a *ATO3* jsou geny kódující transmembránové proteiny, které patří do velké rodiny proteinů YaaH. Ato1p a Ato3p jsou velmi podobné v aminokyselinovém složení (78 %), zatímco Ato2p je vůči nim méně homologní (35 %) (Palková et al., 2002). Fluorescenční mikroskopie Ato proteinů značených GFP ukázala, že Ato1p a Ato3p proteiny lokalizují v mikrodoménách plazmatické membrány bohatých na ergosterol, přičemž tvorba Ato1p v mikrodoménách je závislá na pH. Ato2p má naopak rovnoměrnou distribuci v plazmatické membráně (Řičicová et al., 2007). Studiem proteinových interakcí GFP značených Ato proteinů v buňkách pomocí metody FLIM (fluorescence lifetime imaging) bylo zjištěno, že proteiny Ato1p a Ato2p interagují a mohou tvořit komplexy, ale nebyla zjištěna žádná interakce mezi Ato1p a Ato3p nebo Ato2p a Ato3p. Zároveň Ato1p a Ato3p dokáží interagovat sami se sebou (Strachotová et al., 2012).

Přesná funkce Ato proteinů není dosud známa, existuje ovšem mnoho indicií, že by se mohlo jednat o transportéry amonných iontů. Delece jednotlivých Ato proteinů má za následek sníženou produkci amoniaku (Palková et al., 2002). Zvýšená exprese Ato proteinů silně koreluje se začátkem produkce amoniaku a Ato proteiny mohou být indukovány vnějším zdrojem amoniaku (Řičicová et al.,

2007). Respiračně deficientní ρ0 buňky zvyšují produkci Ato3p, aby odstranily přebytek amoniaku (Guaragnella a Butow, 2003). Existují však i práce, které zmiňují jinou funkci, třeba, že Ato1p by mohl být acetátovým transportérem (Paiva et al., 2004).

Klíčovou roli při přepínání kolonie do alkalické fáze hraje transkripční faktor Sok2p. Jeho exprese je v alkalické fázi zvýšená a zároveň jeho delece má za následek neschopnost kmene přepnout do alkalické fáze růstu (Palková et al., 2002). Protein Sok2p je negativním regulátorem pseudohyfální diferenciace a hraje důležitou roli v dráze cAMP dependentní proteinkinázy A (PKA) (Ward et al., 1995; Pan a Heitman, 2000).

Obří kolonie deleční mutanty *sok2* nedokáže produkovat amoniak a buňky kolonie mají větší problémy s přežíváním než se děje u rodičovského kmene. Transkriptomová analýza *sok2* deletanty a rodičovského kmene také ukázala, že u mutanty nedojde k potřebným změnám, nutným pro přechod do alkalické fáze. Nedochází u ní ke spuštění metabolismu beta oxidace mastných kyselin, produkci transportérů amoniaku – Ato proteinů, změně metabolismu aminokyselin a k úpravě stresové odpovědi (Obrázek 16) (Váchová et al., 2004).

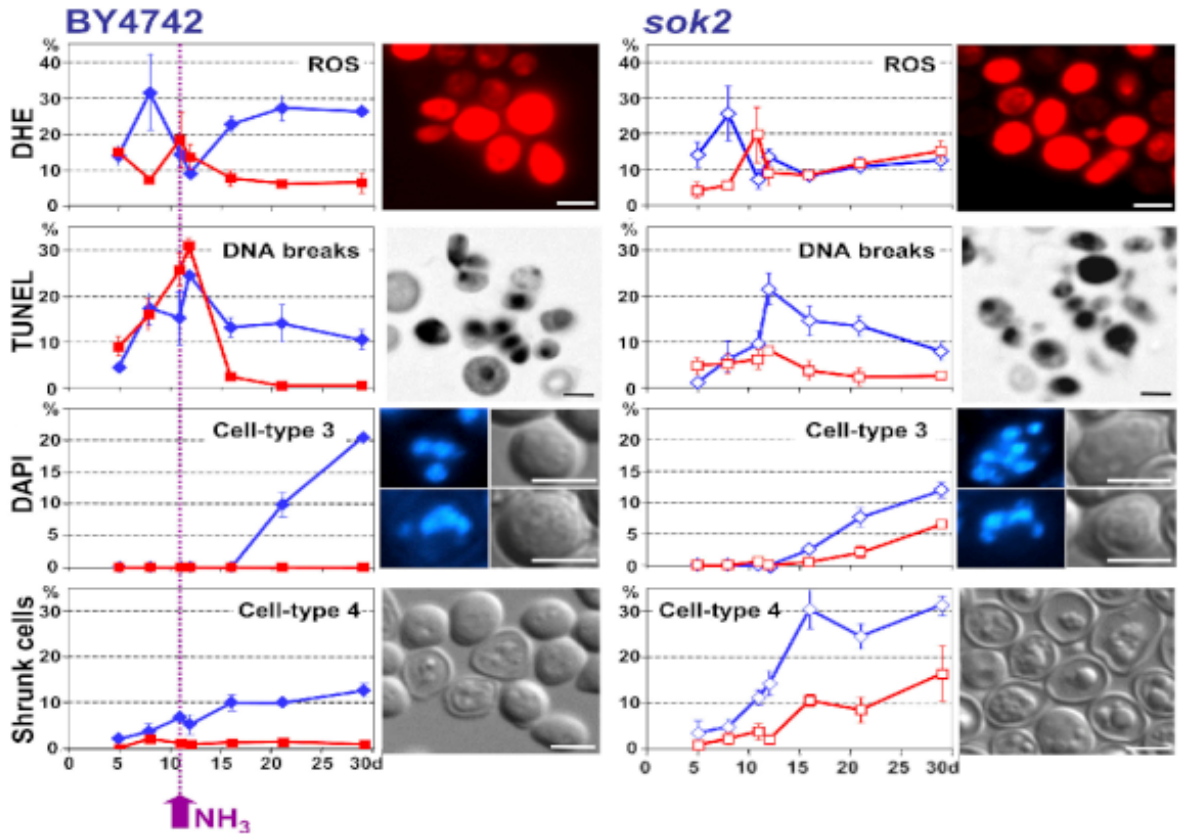


Obrázek 16: Schéma hlavních rozdílů vyskytujících se v koloniích rodičovského kmene a delečního mutanta *sok2*; červená barva znamená aktivovanou expresi; zelená barva označuje represi (Váchová et al., 2004).

Pro správný vývoj a diferenciaci kolonie hraje rovněž důležitou roli ochrana před volnými kyslíkovými radikály (ROS). S ROS, které vznikají během dýchání, se buňky *S. cerevisiae* vypořádávají pomocí enzymů cytosolické superoxid dismutázy Sod1p, mitochondriální superoxid dismutázy Sod2p a cytosolické katalázy Ctt1p. Delece *sod2* a *ctt1* způsobuje defekty ve vývoji kolonie a problémy

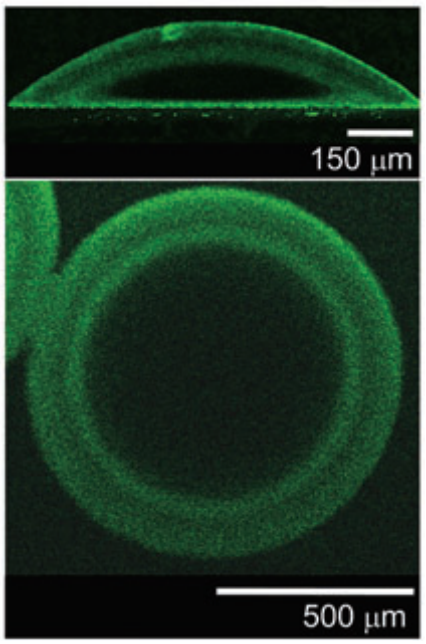
s alkalizací podobné deleci *sok2*, zatímco delece cytosolické *sod1* nemá vliv na vývoj kolonie. Tyto změny by mohly ukazovat na vliv mitochondrií a Sod2p při regulaci procesů vedoucích k alkalizaci (Čáp et al., 2009).

Po přepnutí z acidické do alkalické fáze se objevuje výrazná horizontální diferenciace kolonie, na vnější okraj a střed kolonie, která ovlivňuje přežívání jednotlivých populací. Regulovaná buněčná smrt u kvasinek (YCD) je velmi podobná programované buněčné smrti u vyšších eukaryot (PDC). V acidické fázi růstu kolonie je výskyt znaků pro YCD, jakými jsou například vyšší hladina ROS, fragmentovaná jádra a výskyt buněčných torz v kolonii, rozložen rovnoměrně. Po diferenciaci kolonie v alkalické fázi však dochází k rozdílům, kdy YCD je především ve střední části kolonie, méně na okrajích. To však neplatí pro kmen s delecí *sok2*, kde jsou mrtvé buňky z velké části i na okraji (Obrázek 17). Soustředění umírajících buněk do středu kolonie je také nezbytné pro její další vývoj. Při odstranění centrální části kolonie dochází k výraznému zpomalení růstu jejího okraje (Váchová a Palková, 2005). Dále se objevují rozdíly v metabolismu mezi středem a okrajem kolonie, kdy buňky okraje produkují větší množství amoniaku a dochází u nich k zapnutí adaptivního metabolismu (Váchová et al., 2009a).



Obrázek 17: Horizontální diferenciace a rozdíly mezi okrajem (modrá) a středem (červená) kolonie u znaků pro YCD (akumulace ROS, DNA zlomy, fragmentace jádra a buněčná torza) v rodičovském a *sok2* delečním kmeni (převzato a upraveno z Váchová a Palková, 2005).

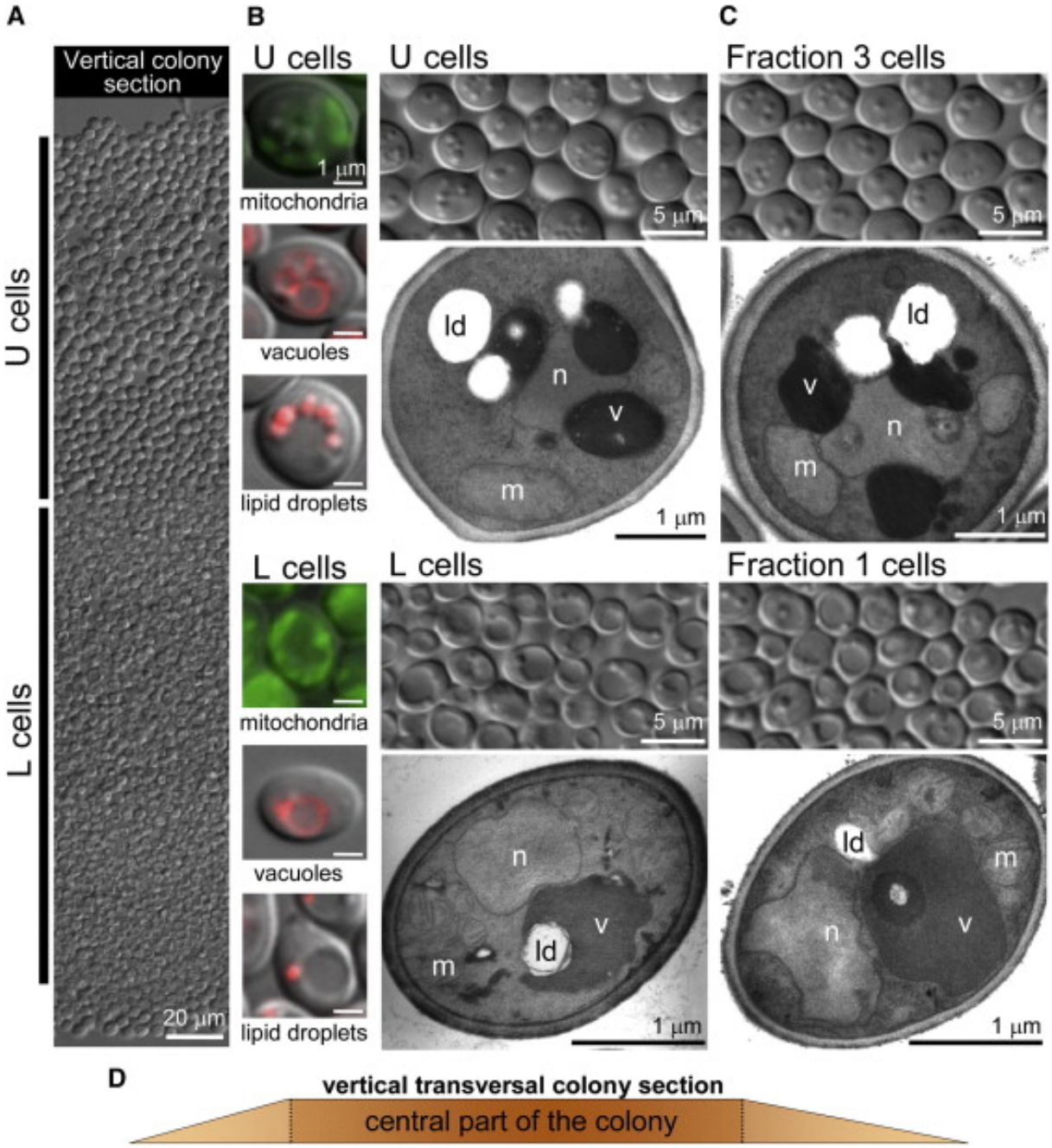
U kolonií během vývoje nedochází pouze k horizontální diferenciaci, ale také k diferenciaci vertikální. Při studiu expres Ato1p-GFP bylo zjištěno, že tato exprese v alkalické kolonii neprobíhá pouze na okrajích kolonie, ale také v horní části středu (Obrázek 18) (Váchová et al., 2009b).



Obrázek 18: Exprese Ato1p-GFP v okrajových částech mikrokolonie. Pohled z boku a zespodu (Váchová et al., 2009b).

Další výzkum přinesl zjištění, že při růstu na respiračním médiu (GM) dochází při přechodu kolonie z acidické do alkalické fáze růstu u obřích kolonií kmene BY4742 k vertikálnímu rozdělení na dvě odlišné buněčné subpopulace – a to U buňky a L buňky. U těchto dvou skupin buněk dochází jak k výrazným morfologickým a fyziologickým rozdílům, a také ke změnám v genové expresi (Čáp et al., 2012).

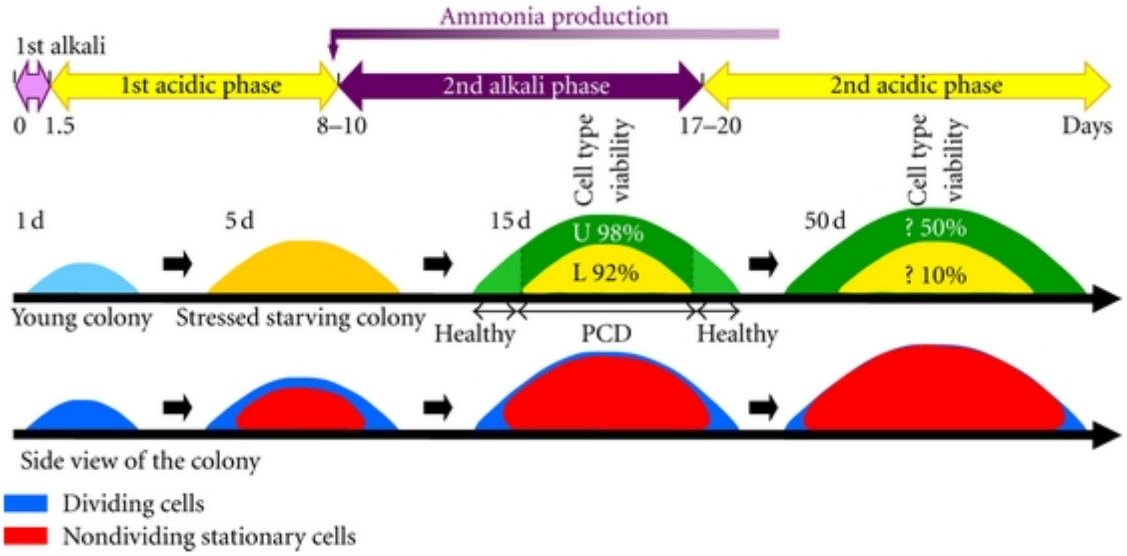
U buňky, které se nacházejí v horní části kolonie, jsou relativně většími buňkami, jež mají velikost 3,92 ± 0,79 mm v průměru. Mají několik menších vakuol, které nejsou zpravidla pozorovatelné pomocí fázového kontrastu, výrazné dobře pozorovatelné lipidické partikule, ve kterých hromadí glykogen, a velké mitochondrie s redukovanými kristami. L buňky, které jsou v dolní části kolonie, jsou oproti L buňkám výrazně menší, mají 2,87 ± 0,46 mm v průměru a velkou výraznou vakuolu, dobře viditelnou pomocí fázového kontrastu, i větší počet menších mitochondrií s dobře vyvinutými kristami (Obrázek 19) (Čáp et al., 2012).



Obrázek 19: Diferencovaná obří kolonie v alkalické fázi růstu. Příčný řez střední částí kolonie a rozdíly v morfologii U buněk a L buněk (Čáp et al., 2012).

Při růstu obří kolonie v časné acidické fázi se biomasa kolonie lineárně zvyšuje (Váchová a Palková, 2005). V této fázi jsou buňky poměrně homogenní a nemají znaky podobající se U nebo L buňkám, velikostně jsou však podobně velké jako L buňky. K diferenciaci dochází při přechodu z acidické do alkalické fáze. Důležité je, že L vrstva se už nadále nezvětšuje a v alkalické fázi růstu dochází už pouze ke zvětšování U vrstvy buněk. To bylo potvrzeno i použitím kmene s teplotně citlivou mutací genu *CDC3* pro septin (Obrázek 20) (Čáp et al., 2012).

Rozmístění dělících se buněk na povrchu a ve vnější části hladké kolonie je tedy velmi odlišné od uspořádání biofilmové kolonie, kde jsou dělící se buňky lokalizovány ve vnitřních částech kolonie (Váchová et al., 2011).

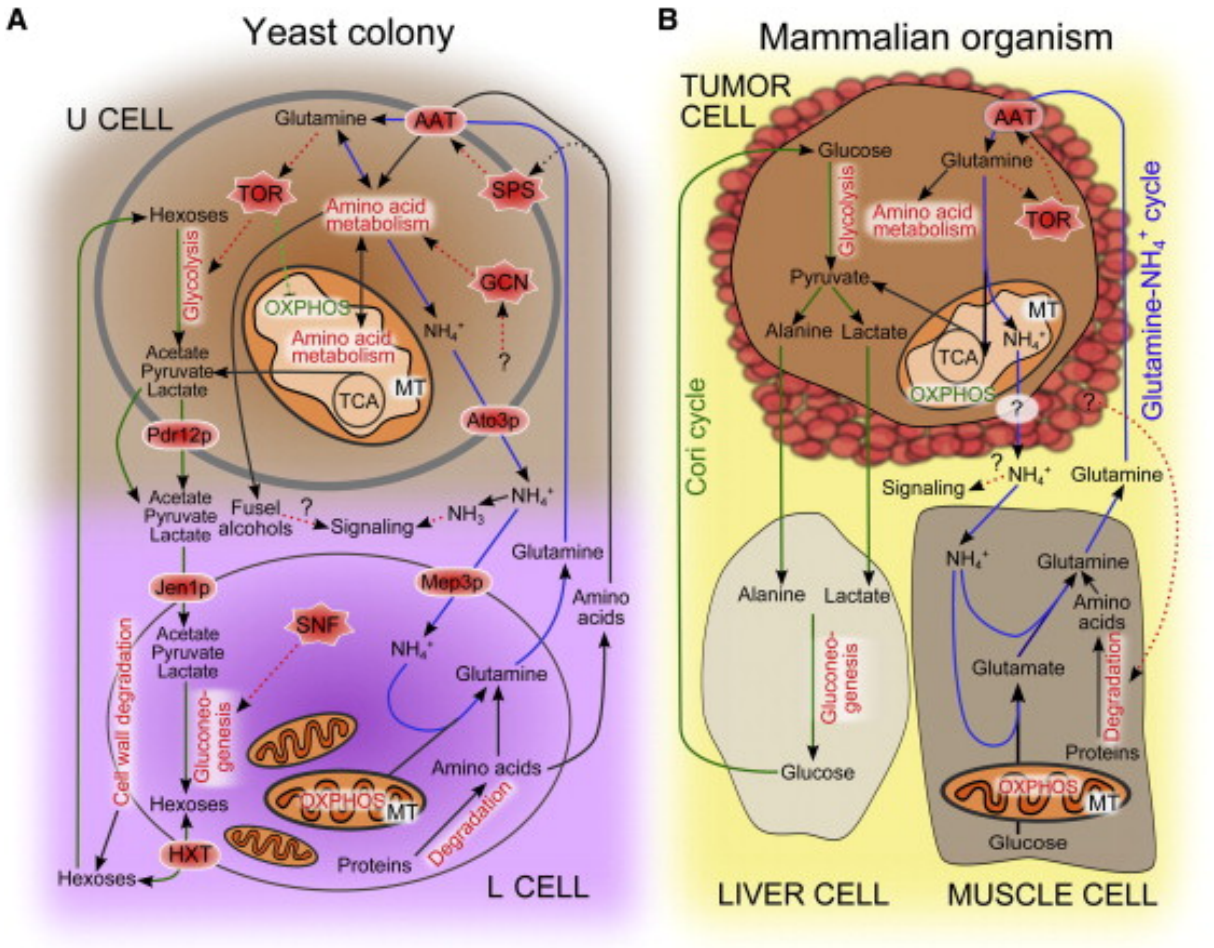


Obrázek 20: Model diferenciace na jednotlivé buněčné subpopulace při vývoji kolonie BY4742 *S. cerevisiae* a rozdělení kolonie na dělící se buňky (modrá), nedělící se stacionární buňky (červená) (Váchová et al., 2012).

U buňky více odolávají stresu a mají vyšší životaschopnost než L buňky. Analýzou transkriptomu bylo zjištěno, že horní buňky jsou metabolicky aktivní, se zapnutým metabolismem aminokyselin, glykolýzou a pentafosfátovým cyklem. Je u nich také vyšší aktivita translačního aparátu. Z regulačních drah je u nich zapnutá TOR dráha (regulace dusíkového metabolismu) – i když ta je spíše typická pro hladovějící buňky – a SPS systém s GCN4 regulací pro geny biosyntézy aminokyselin, které slouží k systému kontroly dostupnosti aminokyselin. Dále u nich hraje také významnou roli autofagie. V kmenech s deletovanými klíčovými geny pro autofagii dochází k výraznému snížení přežívání buněk (Obrázek 21) (Čáp et al., 2012). Podrobná analýza aktivity enzymů metabolismu uhlíku potvrdila, že U buňky, přestože rostou na fermentovatelném zdroji uhlíku, se chovají jako fermentující buňky a mají zvýšenou aktivitu glykolytických enzymů, avšak v omezené míře dokáží rovněž respirovat. Zároveň použití inhibitorů glykolýzy má za následek problémy při tvorbě U vrstvy a také výrazné snížení životaschopnosti buněk (Čáp et al., 2015).

Oproti U buňkám jsou L buňky více citlivé na různé stresové podněty, což vede ke zvýšené expresi genů stresové odpovědi, a zároveň vykazují také znaky hladovění. Je u nich zvýšená biogeneze mitochondrií, oxidativní fosforylace a vyšší hladina volných kyslíkových radikálů (ROS), dále také zvýšená exprese genů buněčné stěny a z metabolických genů je to metabolismus lipidů. Dále jsou u nich spuštěny degradační dráhy, což napomáhá uvolňování živin do okolí. Z regulačních drah je

v dolních buňkách vysoká aktivita Snf1p, proteinkinázy citlivé na živiny, což ukazuje na nízkou aktivitu TOR a PKA dráhy (Obrázek 21) (Čáp et al., 2012). Podrobná analýza aktivity enzymů metabolismu L buněk ukázala zvýšenou aktivitu Krebsova cyklu a glyoxylátové spojky. Tyto buňky tedy respirují (Čáp et al., 2015).



Obrázek 21: Paralely v metabolické diferenciaci a signalizaci mezi diferencovanou kvasinkovou kolonií (A) a savčím organismem s nádorem (B) (Čáp et al., 2012).

Důležitou roli v obou subpopulacích hraje i homeostáze aminokyselin. Přestože celkové množství je v obou populacích stejné, složení v jednotlivých subpopulacích se hodně liší. Pro U buňky je typické vysoké množství glutaminu a také zvýšená koncentrace glutamátu a argininu. L buňky mají naopak malé množství glutaminu, ale zvýšené množství alaninu, lysinu a GABA (Čáp et al., 2012). Dostupnost a složení aminokyselin jsou důležité pro produkci amoniaku (Zikánová et al., 2002). Při porovnání obou buněčných subpopulací bylo zjištěno, že pouze U buňky produkují amoniak (Čáp et al., 2012).

Další analýza obřích kolonií zjistila, že subpopulace U a L buněk nejsou homogenní a především u spodních L buněk dochází k diferenciaci do dvou dalších subpopulací, které jsou sice morfologicky

podobné, ale liší se ve funkci retrográdní mitochondriální signalizace (Podholová et al., 2016). Podrobnější mapování buněčných subpopulací pomocí RNA sekvenování ukázalo, že ačkoliv k výraznému morfologickému a metabolickému rozlišení na U a L buňky dochází až v alkalické fázi, některé znaky typické pro tyto subpopulace se začínají vyvíjet už u buněk v acidické fázi růstu. Dále jsou buňky okraje kolonie svou genovou expresí více podobné U buňkám z horní části kolonie. U obou populací dochází i k rozsáhlým adaptačním změnám v metabolismu, které se objevují při přechodu z acidické do alkalické fáze. V těchto subpopulacích dochází ke zvýšené expresi genů ovlivňujících metabolismus vitaminů/kofaktorů, modifikaci proteinů, biogenezi ribozomů, translaci a zpracování tRNA/mRNA. U L buněk jsou změny mezi acidickou a alkalickou fází mírné a dochází u nich ke zvýšené expresi genů zapojených do metabolismu zásobních látek, pro respiraci a mitochondriální ATP syntézu, skládání proteinů a kontrolu kvality, oxidační a jiné stresové reakce, a zapojených do degradace proteinů a proteazomální degradace (Obrázek 22) (Wilkinson et al., 2018a).

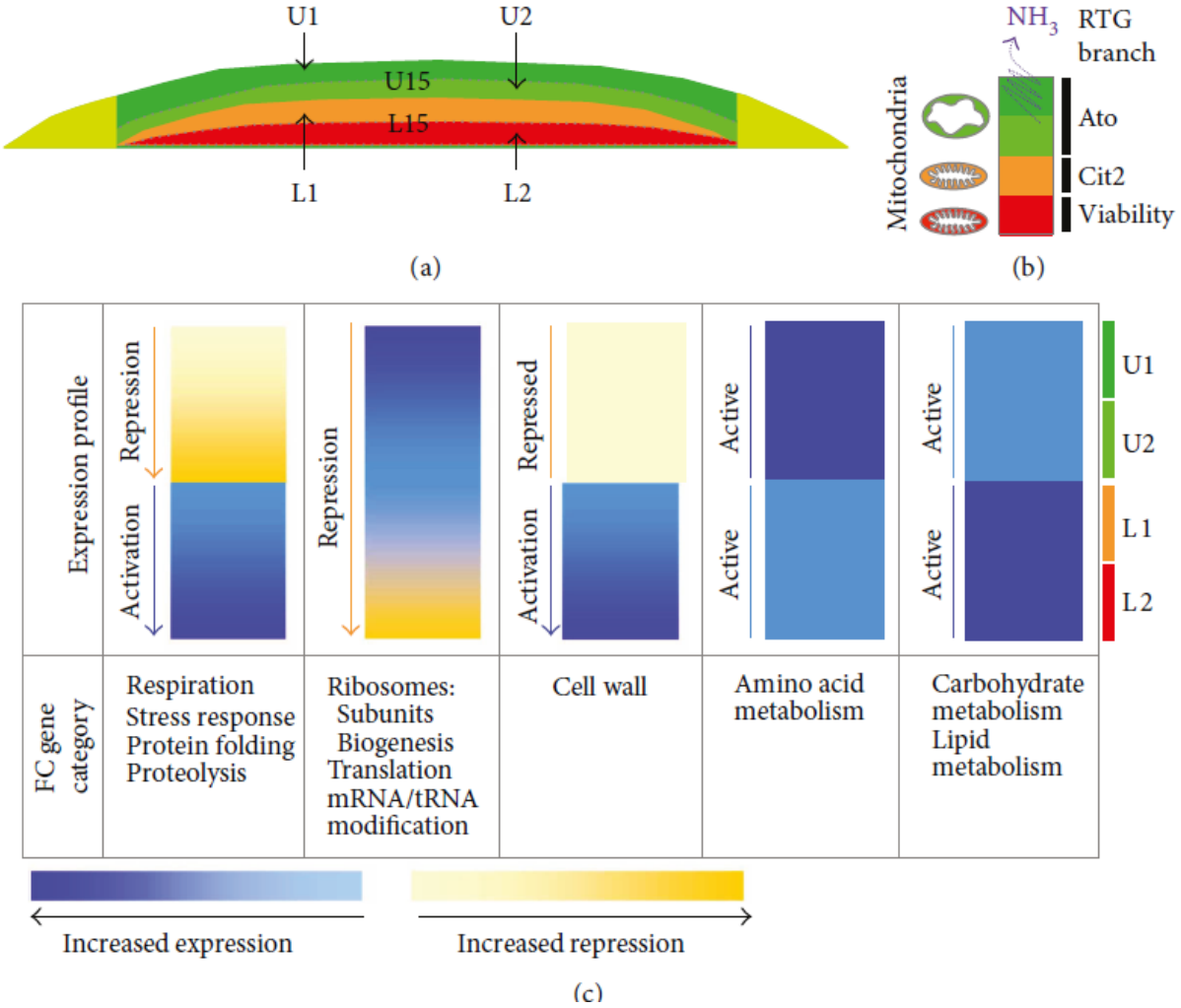
Při bližší analýze U a L subpopulací bylo dále zjištěno, že exprese v horní vrstvě U buněk a dolní vrstvě U buněk je podobná a celá U subpopulace je relativně homogenní. Naproti tomu L vrstva buněk se výrazněji rozděluje na horní a spodní část. Je zajímavé, že expresní profil horní části L buněk je více podobný U buňkám než celkovému profilu L buněk, kdy horní L buňky nesnižují expresi genů typických pro U buňky a zvyšují expresi genů typických pro L buňky (Obrázek 22) (Wilkinson et al., 2018a).

Zjištěna byla také variabilita v dlouhých nekódujících RNA (lncRNA) mezi jednotlivými subpopulacemi, která by mohla také hrát regulační roli pro jednotlivé subpopulace. Největší upregulace lncRNA probíhá v L buňkách (Wilkinson et al., 2018b).

Diferenciace na U a L buňky probíhá podobně jak ve dvoutýdenních obřích koloniích, jež vznikají z buněčné suspenze, tak v 3–4 denních mikrokoloniích, vznikajících z jedné buňky. U buňky v mikrokoloniích a obřích koloniích jsou ve většině parametrů velmi podobné a neexistují mezi nimi velké rozdíly. Některé změny jsou však pozorovatelné v L buňkách, a to především fakt, že dolní buňky z mikrokolonií jsou více odolné vůči různým stresovým podmínkám – což ukazuje, že tyto buňky jsou v lepším fyziologickém stavu. Větší citlivost na stres u L buněk z obřích kolonií by mohla být spojena s chronologickým stárnutím kolonie. Celkově ovšem stáří kolonie není pro diferenciaci rozhodující a oba modely, mikrokolonie a obří kolonie, jsou srovnatelné (Váchová et al., 2013).

Dosavadní poznatky ukazují, že mezi U a L buňkami dochází k výměně živin a odpadních látek, kdy L buňky slouží jako jakási zásobárna pro U buňky. Je zajímavé, že se tento systém velmi podobá výměně probíhající pomocí Coriho cyklu mezi nádorovými buňkami a játry a výměně glutamin-amoniak zjištěné mezi nádorovými a svalovými buňkami. U buňky se svými charakteristikami velmi

podobají nádorovým buňkám, které často také fungují na aerobní glykolýze, mají často sníženou respiraci, jako zdroj živin využívají glutamin a produkují amoniak (Obrázek 21) (Čáp et al., 2012).

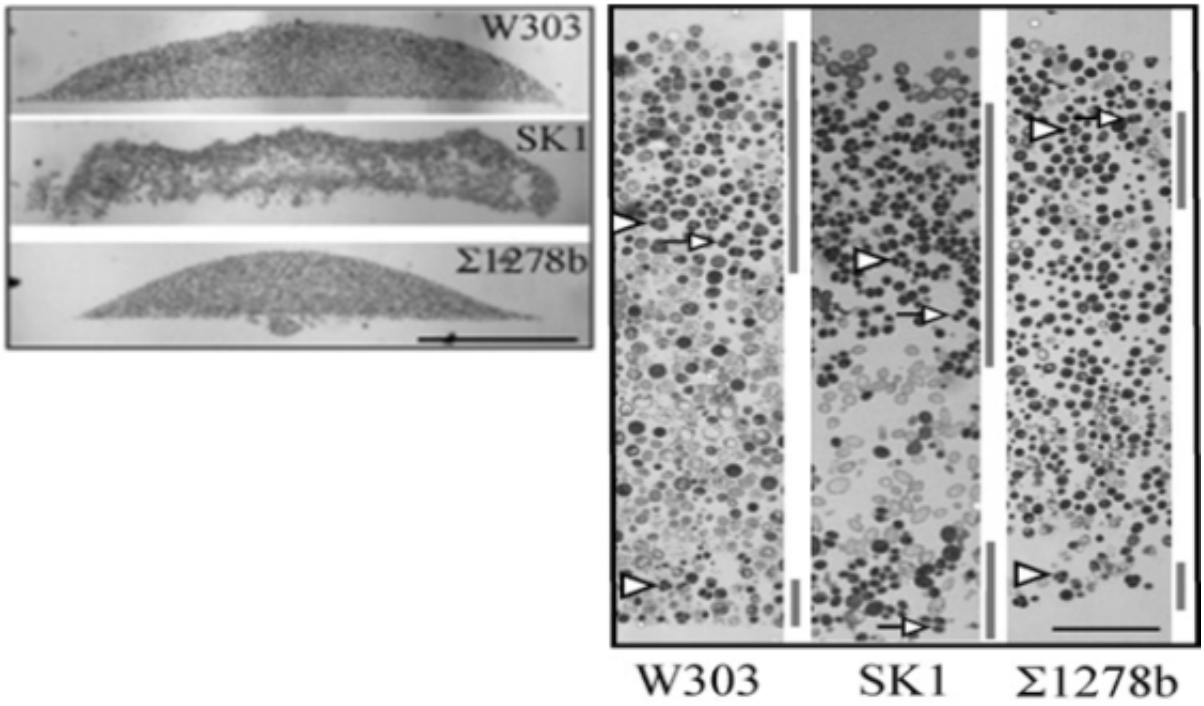


Obrázek 22: Schéma buněčných subpopulací v patnáctidenní obří kolonii a expresní profily vybraných skupin genů ve střední části kolonie na základě RNA sekvenování (Wilkinson et al., 2018a).

3.3.4 Diferenciace a sporulace v koloniích *S. cerevisiae*

Dalším příkladem pro diferenciaci kvasinkové kolonie je lokalizace sporulace v pozdních fázích vývoje na okrajích kolonie (Purnapatre a Honigberg, 2002). Při růstu laboratorního kmene W303, který tvoří hladké kolonie, na acetátovém médiu s nízkou koncentrací glukózy a s respirujícími buňkami dochází nejprve k diferenciaci kvasinkových mikrokolonií na dvě oddělené buněčné vrstvy. Tedy na horní vrstvu, kde v její spodní části dochází ke sporulaci a tvorbě spor (populace meiotických buněk), a spodní vrstvu, kde se nacházejí velké osmosenzitivní buňky (populace podpůrných „feeder" buněk). V pozdějších fázích vývoje kolonie se vytváří třetí vrstva na spodku kolonie, kde také dochází ke tvorbě spor, a také se objevuje rozšíření sporulace do horní vrstvy (Obrázek 23) (Piccirillo et al.,

2010; Piccirillo et al., 2015). Tato diferenciace je odlišná od diferenciace kmene BY4742 na U a L vrstvy, protože kmen BY4742 je haploidní (Čáp et al., 2012). Bylo ukázáno, že tento vzor sporulace je stejný jak u hladkých kolonií (kmen W303), tak u strukturovaných kolonií (kmen SK1) (Obrázek 23). Kromě toho bylo také zjištěno, že ke sporulaci dochází i v částech kolonií, které invazivně zarůstají do agaru (Piccirillo a Honigberg, 2010).

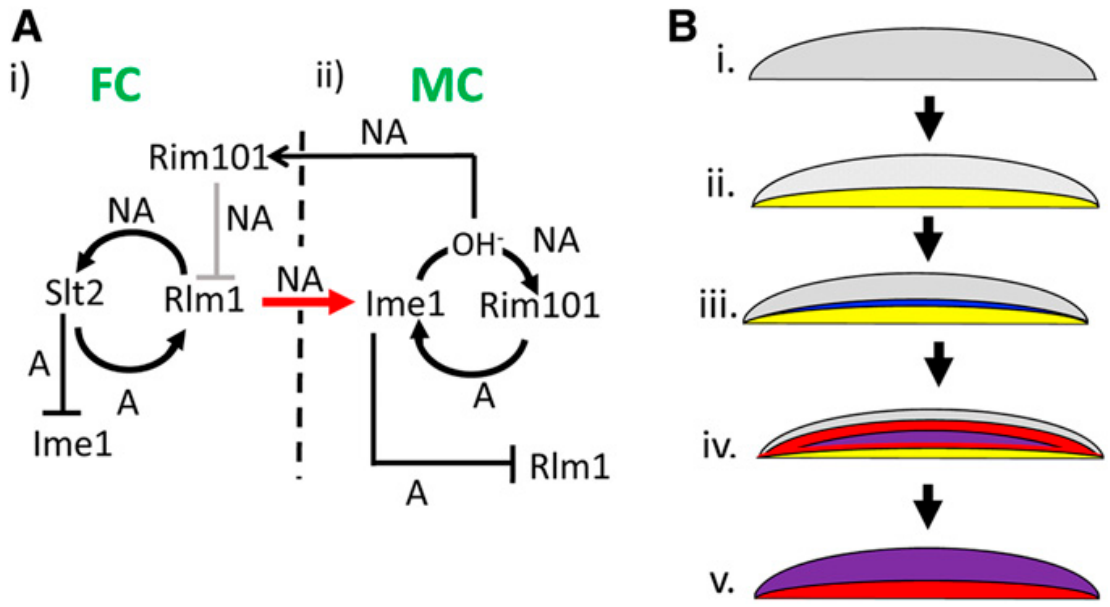


Obrázek 23: Lokalizace sporulace v kmenech W303, SK1 a Σ1278b. Šipky ukazují na lokalizaci spór; řez osmidenními koloniemi (A); (převzato a upraveno z Piccirillo a Honigberg, 2010).

Regulace sporulace a diferenciace v rámci kolonie je řízena několika drahami. Po diferenciaci je v populaci meiotických buněk indukován hlavní regulátor sporulace Ime1p, který indukuje tvorbu spor (Piccirillo et al., 2010). Kromě toho může být sporulace také aktivována pomocí alkalického pH a aktivací Rim101/PacC dráhy (Peñalva a Arst, 2004). Dále screening delečních mutantů na pozadí kmene W303 *S. cerevisiae* odhalil zapojení MAPK dráhy integrity buněčné stěny (CWI), kdy delece vybraných členů této dráhy ukázali, že důležitým cílem je transkripční faktor Rlm1p, který je aktivován specificky ve vrstvě pod sporulujícími buňkami (podpůrné buňky), a delece *rlm1* vede ke spuštění sporulace v těchto buňkách. Podpůrné buňky pravděpodobně poskytují signály popřípadě živiny potřebné pro sporulující buňky nad nimi (Piccirillo et al., 2015).

Během vývoje kolonie dochází nejprve k aktivaci zpětnovazebné smyčky Rlm1p-Stl2p, jež následně pomocí buněčně autonomního mechanismu aktivuje smyčku Rim101p-Ime1p v meiotických

buňkách. Tato druhá smyčka nakonec pomocí buněčně autonomního mechanismu inhibuje první smyčku (Obrázek 24) (Piccirillo et al., 2019).



Obrázek 24: (A) Model propojení Rim101p-Ime1p a Rlm1p-Slt2p zpětnovazebních smyček mezi krmnými a sporulujícími buňkami; (B) Prostorový vzorec genové exprese těchto regulátorů ve vyvíjejících se koloniích: (i) v koloniích neprobíhá diferenciace (šedá barva), (ii) dochází k aktivaci Rlm1p-Slt2p smyčky v krmných buňkách ve spodní části kolonie (žlutá), (iii) následkem toho dochází k aktivaci Ime1p ve vrstvě buněk nad krmnými buňkami (modrá), (iv) exprese Ime1p má za následek zvýšené pH a aktivaci Rim101p v sousedních buňkách (červená) a zároveň zpětnovazební smyčka rozšiřuje oblast aktivity Ime1p-Rim101p (fialová), (v) ve finále vrchní oblast kolonie je regulována Rim101p-Ime1p a v důsledku zvýšeného pH v dolní části kolonie a aktivního Rim101p dochází k potlačení aktivity Rlm1 (Piccirillo et al., 2019).

3.4 Regulace důležité pro vývoj kolonií

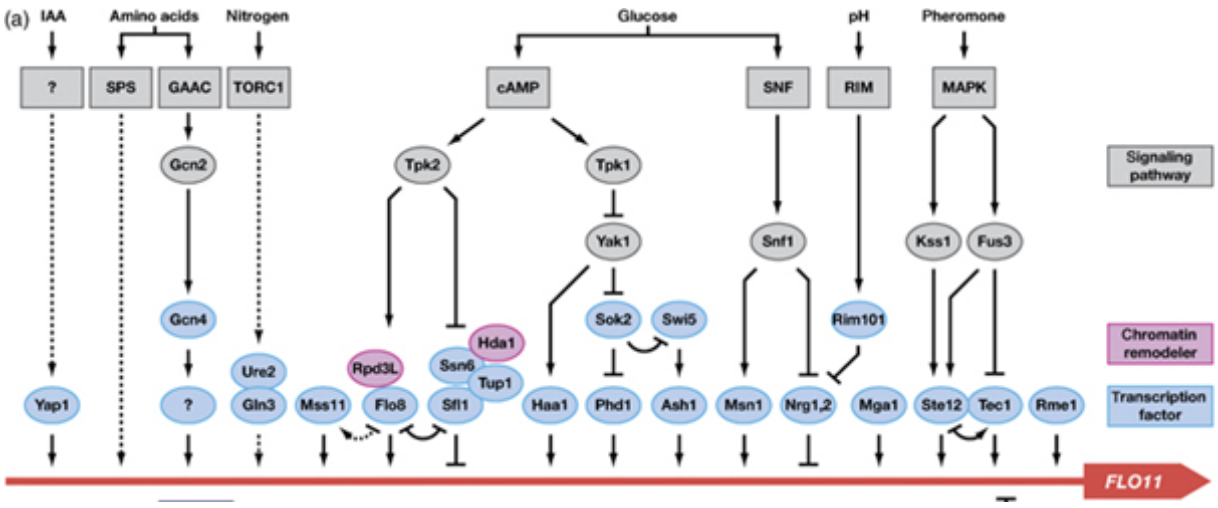
Během vývoje kolonií se uplatňují různé mechanismy, které mají vliv na formování jednotlivých subpopulací. Cílem této kapitoly je zaměřit se na dvě vybrané regulace, které jsou pro formování kolonií důležité. První z nich je regulace exprese proteinu Flo11p, který je zásadní pro formování strukturované (biofilmové) kolonie, pseudohyfální růst a adhezi buněk k podkladu u divokého kmene BR-F *S. cerevisiae*. Druhou je mitochondriální retrográdní signalizace, která spojuje mitochondrie s jádrem buňky, kdy fyziologický stav mitochondrií hraje důležitou roli při diferenciaci hladké kolonie laboratorního kmene BY4742 *S. cerevisiae*.

3.4.1 Regulace exprese FLO11

Glykoproteiny na povrchu buněk slouží ke vzájemné adhezi mezi buňkami a adhezi k substrátu. U *S. cerevisiae* se jedná především o rodinu Flo proteinů – nazývaných flokuliny –, která se dělí na dvě skupiny. První část této rodiny obsahuje proteiny Flo1p, Flo5p, Flo9p a Flo10p, které se podílejí na adhezi mezi buňkami a vytváření mnohobuněčných shluků v tekutých prostředích. Ve druhé skupině je protein Flo11p, pleiotropní adhezin, glykoprotein ukotvený pomocí GPI kotvy na povrchu buněk, zapojený do adheze buněk k povrchům, vláknitého růstu, invazivního růstu a tvorby strukturovaných útvarů. Na rozdíl od ostatních Flo proteinů není jeho funkce závislá na přítomnosti Ca^{2+} (Guo et al., 2000; Halme et al., 2004; Brückner a Mösch, 2012).

Flo11p je klíčovým proteinem potřebným pro tvorbu většiny mnohobuněčných kvasinkových útvarů, ať už flórů (Ishigami et al., 2004, Ishigami et al. 2006; Zara et al., 2009), biofilmů (Reynolds a Fink, 2001; Andersen et al., 2014), matů (Reynolds, 2018), či strukturovaných kolonií (Šťovíček et al., 2010; Vopálenská et al., 2010; White et al., 2011). U strukturovaných kolonií vede delece flo11p ke ztrátě struktury a tvorbě hladkých kolonií (Šťovíček et al., 2010; Vopálenská et al., 2010).

Regulace exprese Flo11p probíhá na několika úrovních. Zaprvé pomocí konvenční genové regulace, kdy promotor genu *FLO11* je neobvykle dlouhý (velikost je kolem 3 kb) a obsahuje nejméně čtyři upstream aktivační sekvence a devět represních elementů, jeho exprese je regulována mnoha signály z různých signálních kaskád – jakými jsou feromonová Fus3p/Kss1p mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK) dráha, glukózou regulované cAMP-dependentní proteinkinázy A (PKA) a Snf1p dráhy, aktivace dusíkem se zapojením TORC1 komplexu a hladověním na aminokyseliny se zapojením Gcn2p a Gcn4p systému obecného systému kontroly aminokyselin (*Obrázek 25*) (Rupp et al., 1999; Vinod et al., 2008; Brückner a Mösch, 2012).



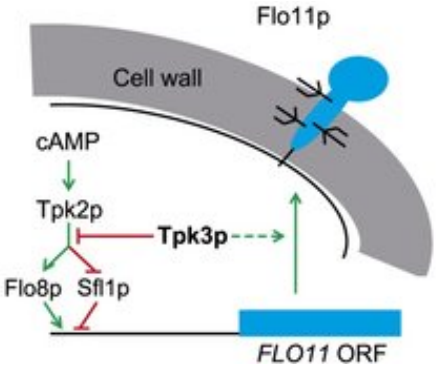
Obrázek 25: Schéma genové regulace promotoru genu FLO11 (Brückner a Mösch, 2012).

Exprese Flo11p je rovněž ovlivňována epigeneticky. Epigenetické umlčení genu *FLO11* reguluje klíčový vývojový přepínač histon deacetyláza (HDAC) Hda1p, kdy jeho delece vede k expresi Flo11p ve všech buňkách (Halme et al., 2004) a promotor se může nacházet mezi třemi různými stavy epigenetické regulace (epigeneticky umlčeným, kompetentním a transkripčně aktivním) (Octavio et al., 2009).

Funkce Flo11p je mimo jiné regulována i pomocí časté rekombinace tandemových repetic v rámci genu. U *S. cerevisiae* dochází k velké variaci v délce genu *FLO11* mezi kmeny – a to od 3 kb až k délce přes 6 kb. Bylo prokázáno, že větší délka repetic má vliv na lepší tvorbu biofilmu (Zara et al., 2009).

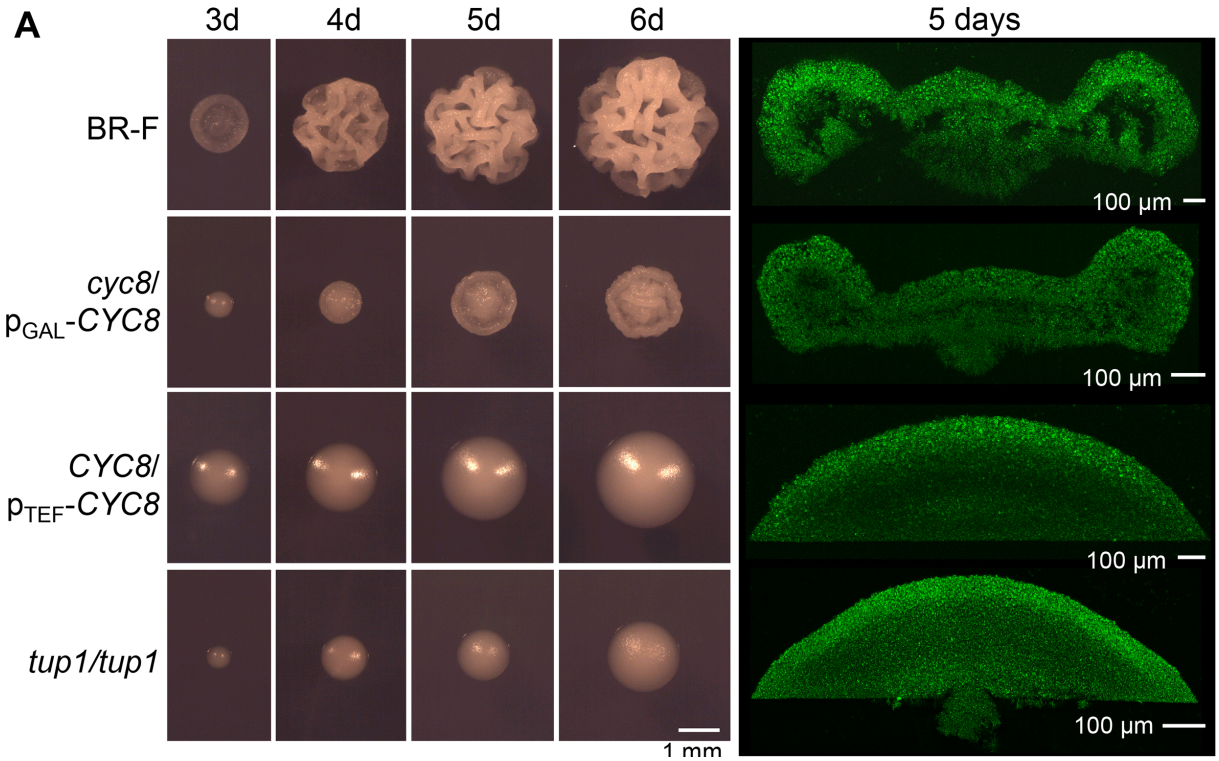
Jak už bylo zmíněno dříve, Flo11p je nezbytný pro uchycení kvasinkových biofilmů *S. cerevisiae* k podkladu (Reynolds a Fink, 2001; Andersen et al., 2014). Důležitá je přitom role glukózou regulované cAMP-dependentní proteinkinázy A (PKA), kdy zvýšená koncentrace glukózy, popřípadě fermentovatelné zdroje uhlíku, mají za následek změnu fenotypu a ze strukturované kolonie se stává hladká (Granek a Magwene, 2010; Brückner a Mösch, 2012). Jedná se však o rozdílný mechanismus změny morfologie kolonie oproti dříve popsanému fenotypovému přepínání přírodních kmenů (kapitola 3.3.1.1). Prvním krokem při formování biofilmů je nezbytná adheze buněk k podkladu a v tomto kroku je důležitá regulace přes Tpk proteiny (Robertson a Fink, 1998; Malcher et al., 2011; Andersen et al., 2014).

Aktivita proteinkinázy A (PKA) je regulována pomocí cAMP, kdy vazba cAMP na regulační podjednotku Bcy1p uvolní katalytickou podjednotku Tpk, čímž dojde k aktivaci její kinázové aktivity. *S. cerevisiae* má tři izoformy Tpk1p, Tpk2p a Tpk3p (Santangelo, 2006). Každá z izoforem však reguluje expresi jiným způsobem. Tpk1p inhibuje expresi Flo11p přes kinázu Yak1p a transkripční faktor Sok2p (Malcher et al., 2011), avšak v některých experimentech vliv Tpk1p nebyl prokázán (Robertson a Fink, 1998). Tpk2p funguje jako aktivátor exprese Flo11p, kdy jeho delece má za následek ztrátu pseudohyfálního růstu. Funguje dvěma způsoby, kdy zaprvé aktivuje transkripční faktor Flo8p, což je aktivátor Flo11p, a zadruhé inaktivuje transkripční faktor Sfl1p, kterým je represor Flo11p (Robertson a Fink, 1998; Santangelo, 2006).



Obrázek *26:* Model vlivu Tpk3p na transkripční a posttranskripční regulaci Flo11p (Andersen et al., 2014).

Delece Tpk3p má za následek zvýšený pseudohyfální růst (Robertson a Fink, 1998) a exprese Flo11p je v deleční mutantě výrazně zvýšená, avšak nedochází k adhezi buněk k podkladu a tvorbě biofilmu, což by mohlo znamenat, že Tpk3 funguje jako negativní regulátor na transkripční úrovní, ale zároveň i jako pozitivní regulátor na posttranskripční regulaci (*Obrázek 27*) (Andersen et al., 2014).

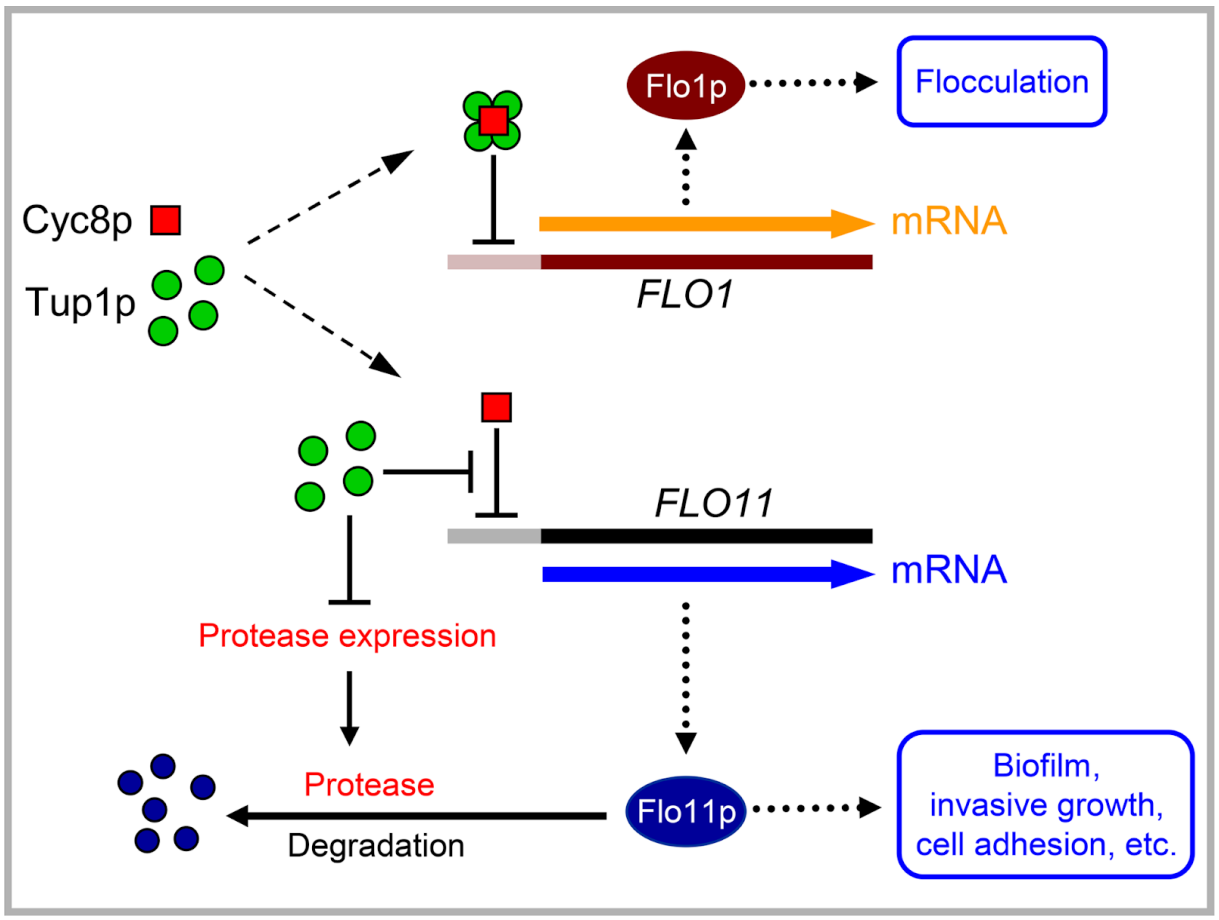


Obrázek *27*: Vývoj kolonií a jejich architektury v závislosti na různé úrovni Tup1p a Cyc8p (Van Nguyen et al., 2018).

V nedávné době bylo ukázáno, regulační faktory Cyc8p a Tup1p hrají roli při vývoji strukturovaných kolonií. Oba regulátory působí proti sobě, Cyc8p brání tvorbě biofilmových struktur a Tup1p je pozitivním regulátorem nezbytným pro jejich vývoj. Při růstu na glycerolovém médiu

nadprodukce Cyc8p nebo delece *tup1* vytvářejí hladké kolonie, zatímco minimální exprese Cyc8p (delece není životaschopná) vytváří strukturované kolonie. Antagonismus těchto dvou regulátorů je však specifický pro regulaci invazivity buněk, adheze k podkladu a buněčné adheze. Pro flokulaci je regulace odlišná a oba ji regulují negativně (Obrázek 28) (Van Nguyen et al., 2018).

Také bylo prokázáno, že Cyc8p a Tup1p regulují hladinu Flo11p opačným způsobem a v různé fázi exprese. Cyc8p funguje jako přímý represor exprese Flo11p. Tup1p, tím, že tvoří komplex s Cyc8p, snižuje jeho aktivitu, což pomáhá ke zvýšené expresi Flo11p. Tup1p navíc pozitivně reguluje hladinu Flo11p v buňkách, neboť zabraňuje jeho degradaci (Obrázek 28) (Van Nguyen et al., 2018).

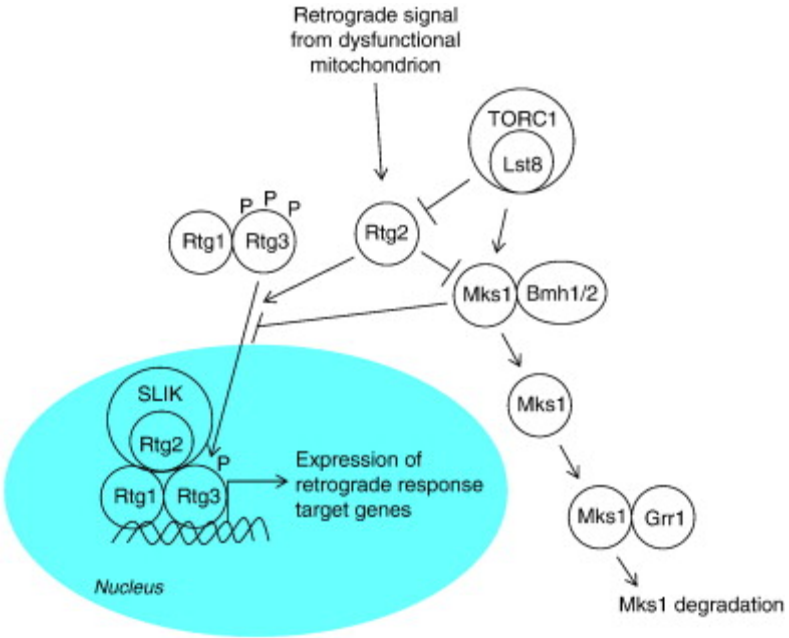


Obrázek 28: Schéma regulace Flo11p pomocí Cyc8p a Tup1p (Van Nguyen et al., 2018).

3.4.2 Mitochondriální retrográdní signalizace RTG

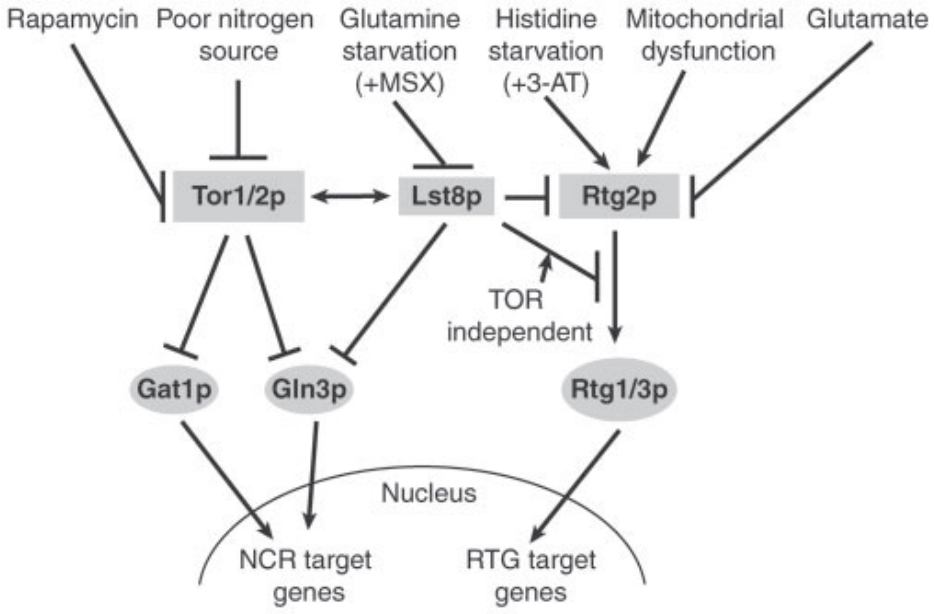
Podstatným rozdílem mezi subpopulacemi U a L buněk, které vznikají v diferencované hladké kolonii kmene BY4742 *S. cerevisiae*, je rozdílná morfologie a fyziologie mitochondrií, tedy velké mitochondrie s redukovanými kristami a sníženou respirací u horních U buněk a větší počet menších mitochondrií s dobře vyvinutými kristami a vyšší respirační aktivitou u spodních L buněk (Čáp et al., 2012, Čáp et al., 2015). A jedním z mechanismů, díky kterým probíhá komunikace mezi mitochondriemi a jádrem buňky, je mitochondriální retrográdní (RTG) signalizace (Butow a Avadhani, 2004; Liu a Butow, 2006; Jazwinski, 2014). První náznaky RTG dráhy byly zaznamenány při studiu kmenů kvasinek se sníženou funkcí mitochondrií nebo nefunkčními mitochondriemi, u kterých docházelo ke zvýšené akumulaci některých mitochondriálních genů kódovaných v jádře (Parikh et al., 1987). Zajímavé je, že původně proteiny Rtg1p a Rtg2p měly jinou úlohu. U *C. albicans* tyto geny aktivují *GAL* geny v odpovědi na indukci galaktózou (Dalal et al., 2016).

Klíčovou částí RTG dráhy jsou proteiny Rtg1p a Rtg3p. Jedná se o helix-loop-helix transkripční faktory (bHLH-LeuZip), oba jsou nutné pro vytvoření komplexu, který se v jádře váže na sekvenci GTCAC, nazývanou R box, nacházející se v regulační oblasti genů retrográdní odpovědi (Rothermel et al., 1995; Rothermel et al., 1997). Neaktivní komplex se nachází v cytosolu a pro jeho aktivaci přesunem do jádra je nezbytná částečná defosforylace Rtg3p (Sekito et al., 2000). Fungování komplexu ovlivňují dále regulátory, a to pozitivní Rtg2p, Grr1p a negativní Mks1p, Lst8p, Bmh1p, Bmh2p (Obrázek 29) (Liu a Butow, 2006; Jazwinski, 2014).



Obrázek 29: Schéma mitochondriální retrográdní dráhy (Jazwinski, 2014).

Hlavním regulátorem RTG dráhy je pozitivní regulátor Rtg2p, který je nutný pro defosforylaci Rtg3p, potřebnou pro vstup komplexu Rtg1p/Rtg3p do jádra (Sekito et al., 2000). Proti němu funguje negativní regulátor Mks1p, což je pleiotropní regulátor, který je kromě RTG dráhy také negativním regulátorem katabolismu dusíku (Edskes et al., 1999) a Ras2-cAMP dráhy, kdy delece *ras2* blokuje RTG dráhu (Kirchman et al., 1999). V RTG dráze Mks1p podporuje fosforylaci Rtg3p, což udržuje komplex Rtg1p/Rtg3p v cytosolu (Sekito et al., 2002). Mks1p se dále nachází v komplexu s dalšími negativními regulátory Bmh1p/Bmh2p, jež jsou navzájem zastupitelné a zabraňují v ubiquitinaci a degradaci Mks1p pomocí Grr1 (Liu et al., 2003; Liu et al. 2005). Druhým pozitivním regulátorem je protein Grr1p, který je částí komplexu ubiquitin ligázy, který pomáhá s degradací negativního regulátoru Mks1p (Liu et al., 2005). Posledním popsaným negativním regulátorem RTG dráhy je protein Lst8p, který je součástí TORC1 komplexu, který negativně reguluje RTG dráhu (Obrázek 30). Dále je RTG dráha také inhibována přítomností glutamátu v buňce, který svou přítomností aktivuje TORC1 komplex. Extracelulární glutamát je rovněž snímán pomocí aminokyselinového senzoru SPS (Komeili et al., 2000; Liu et al., 2001).

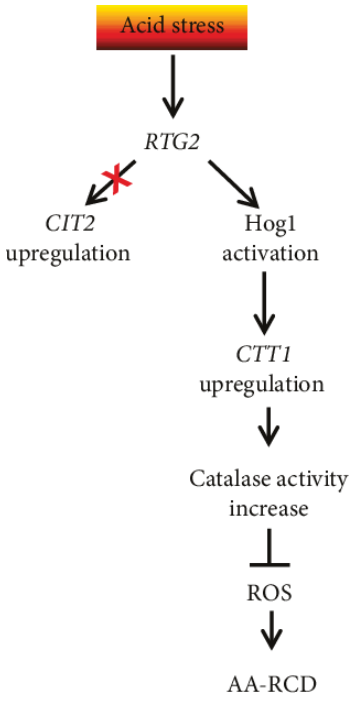


Obrázek 30: Regulace a propojení TOR a RTG drah (Giannattasio et al., 2005).

RTG dráha hraje roli rovněž při kyselém stresu a odolnosti buněk proti regulované buněčné smrti indukované kyselinou octovou (AA-PCD). Při porovnání kultivace buněk v glukóze, kde je potlačena respirace a reprimována RTG dráha, s galaktózou, kde je zvýšená respirace, jako zdroji uhlíku se ukázalo, že v galaktóze jsou buňky více odolné vůči AA-PCD, k čemuž přispívá aktivace RTG dráhy. Avšak důležitá je i role samotného Rtg2p, který funguje i nezávisle na RTG dráze (Guaragnella et al., 2013). Na rafinóze je při úniku před AA-RDS propojena uhlíková katabolická represe (CCR), přes

proteiny Adr1p a Cat8p, které slouží jako pozitivní regulátory genů retrográdní odpovědi, přes Rtg2p (Laera et al., 2016). Na glukóze, kde je RTG dráha potlačena (Guaragnella et al., 2013), je AA-PCD spuštěna pomocí aktivace kinázy Hog1p, jež je přitom aktivována pomocí Rtg2p (*Obrázek 31*) (Guaragnella et al., 2019).

Mitochondriální dysfunkce vede k proliferaci a aktivaci peroxizomů. Tyto změny metabolismu pomáhají buňkám získat potřebný přísun α-ketoglutarátu pro syntézu glutamátu. Při aktivaci RTG je klíčová aktivace glyoxylátového cyklu (Jazwinski, 2014). Byly popsány dvě skupiny genů regulovaných RTG dráhou. První skupinou se silnou retrográdní odpovědí jsou *CIT2*, kódující peroxizomální izoformu citrát syntázy v glyoxylátovém cyklu, a *DLD3*, kódující 2-hydroxyglutarát transhydrogenázu a minoritní D-laktát dehydrogenázu. Jako hlavní marker retrográdní odpovědi je nejčastěji používán Cit2p. Druhá skupina obsahuje několik genů cyklu kyseliny trikarboxylové (TCA) – a to *CIT1* (mitochondriální izoforma citrát syntázy), *ACO1* (akonitáza) a *IDH1/2* (NAD+-dependentní izocitrát dehydrogenáza). U této skupiny dochází k odpovědi pouze u buněk s narušenými mitochondriemi, při ztrátě mitochondrií nedochází ke spuštění regulace (Liu a Butow, 1999; Liu a Butow, 2006).



Obrázek 31: Model adaptivní dráhy AA-PCD způsobené kyselým stresem při růstu na glukóze (Guaragnella et al., 2019).

Kromě RTG dráhy byla u kvasinek popsána ještě minoritní dráha *AFO1/MRPL25*, která je spuštěná při deleci *mrpl25*, proteinu velké podjednotky mitochondriálního ribozomu, což vede k deficientní respiraci u této mutanty. Tato delece při růstu na glukóze prodlužuje replikační dobu dožití buněk v porovnání s ρ0 BY4741 kontrolou, avšak nedochází ke změnám přežívání v porovnání

s rodičovským BY4741 mající funkčním mitochondrie. Delece *mrpl25* také neměla vliv na expresi Cit2p, který byl použit jako marker aktivace RTG dráhy, což ukazuje, že tato dráha je nezávislá na RTG. Mrpl25p funguje v součinnosti s TOR dráhou a pro její fungování jsou potřebné Tor1p a Sfp1p (Heeren et al., 2009).

O RTG regulaci u jiných organismů toho není moc známo. *RTG2* nemá homology u vyšších eukaryot (Jazwinski, 2014b). U červa *Caenorhabditis elegans* bylo ovšem zjištěno, že realizována dlouhověkosti je regulována pomocí cytoprotektivních drah, na kterých se podílí retrográdní odpověď aktivovaná dysfunkcí mitochondrií (Shore a Ruvkun, 2013) – u myší byl identifikován G-proteinový supresor 2 (GPS2) jako mediátor mitochondriální retrográdní signalizace a aktivátor jaderně kódovaných mitochondriálních genů při depolarizaci mitochondrií (Cardamone et al., 2018).

4. Seznam použitých metod

veškeré použité metody jsou popsány v přiložených publikacích

- Základní mikrobiologické metody
- Transformace *S. cerevisiae*
- PCR a Elektroforéza nukleových kyselin
- Zobrazovací metody určené ke sledování kolonií a jejich růstu
- Izolace buněčných subpopulací
- Příprava příčných řezů mnohobuněčných struktur
- Světelná a fluorescenční mikroskopie
- Konfokální mikroskopie
- Testy adheze buněk
- Izolace proteinů a western blot analýza
- Izolace RNA a northern blot analýza
- Proteomická analýza buněčných subpopulací

5. Výsledky

5.1 Glucose, Cyc8p and Tup1p regulate biofilm formation and dispersal in wild *Saccharomyces cerevisiae*

Van Nguyen P., Plocek V., Váchová L., Palková Z.

NPJ Biofilms Microbiomes. 2020 Feb 13;6(1):7. doi: 10.1038/s41522-020-0118-1.

IF_{2019} = 7,067

Na kmeni BR-F *S. cerevisiae* bylo ukázáno, že regulační faktory Cyc8p a Tup1p fungují protichůdně při regulaci tvorby biofilmových kolonií, kdy Tup1p je nezbytný pro tvorbu strukturované kolonie, zatímco zvýšená exprese Cyc8p má za následek tvorbu hladkých kolonií.

V této práci jsme se zaměřili na vliv regulátorů Cyc8p a Tup1p při vývoji SLI biofilmu *S. cerevisiae* na rozhraní polystyrenu a vodného prostředí, a to především na první fázi vývoje biofilmu, konkrétně adhezi buněk. Ukázali jsme, že buňky kmene BR-F, které tvoří na GM médiu biofilmové kolonie, jsou schopné adheze na polystyren, zatímco buňky kmenů BR-S a BY4742, jež tvoří hladké kolonie na GM médiu, neadherují. Zároveň jsme zjistili, že buňky jak planktonní, tak statické kultury kmene BR-F jsou schopny adherovat a regulace Tup1p a Cyc8p funguje podobně pro oba typy buněk.

Dále jsme ukázali, že Tup1p působí jako pozitivní regulátor adheze a exprese Flo11p v nepřítomnosti glukózy, zatímco Cyc8p funguje jako negativní regulátor adheze a exprese Flo11p jak za přítomnosti, tak za absence glukózy. Zjistili jsme také, že za přítomnosti glukózy dochází k uvolňování buněk z biofilmu v důsledku zvýšené exprese Cyc8p. K uvolňování buněk přitom stačí i nízké koncentrace glukózy, srovnatelné s hladinou glukózy v krvi. Navrhli jsme model vývoje a šíření biofilmů kvasinek *S. cerevisiae* v závislosti na přítomnosti glukózy a expresi Cyc8p, v prostředí, kde by tento vývoj mohl způsobovat systémové infekce.

Také jsme vyvinuli novou metodu fixace a přípravy vzorků, díky které jsme schopni připravovat příčné řezy nárůsty neadherovaných buněk a biofilmů, které se tvoří v mikrotitračních jamkách. Díky tomu jsme získali nástroj, pomocí něhož můžeme nahlédnout do diferenciace těchto populací.

Můj podíl na publikaci: V práci jsem se zabýval převážně mikroskopickou analýzou (Obr. 2b, 3 a 4b, Supplementary Obr. 3 a 4), a to jak produkce Flo11p-GFP v závislosti na funkci Cyc8p a Tup1p (adhezní experimenty), tak přímo analýzou ultrastruktury biofilmu (vertikální řezy a vizualizace morfologie buněk jednotlivých vrstev biofilmu), a expresí Tup1p-GFP a Cyc8p-GFP *in situ* v biofilmu. Pro analýzy ultrastruktury biofilmu jsem vyvinul novou metodu fixace biofilmu, resp. neadherovaných buněčných vrstev. Dále jsem se zabýval i změnami ultrastruktury biofilmů v čase a kvantifikací dat týkajících se vývoje „tloušťky“ biofilmu. Participoval jsem na sepisování publikace.

npj | Biofilms and Microbiomes

www.nature.com/npjbiofilms

ARTICLE OPEN

Check for updates

Glucose, Cyc8p and Tup1p regulate biofilm formation and dispersal in wild *Saccharomyces cerevisiae*

Phu Van Nguyen[1,3], Vítězslav Plocek[1,3], Libuše Váchová[2] and Zdena Palková[1]✉

Saccharomyces cerevisiae is a mainly beneficial yeast, widely used in the food industry. However, there is growing evidence of its potential pathogenicity, leading to fungemia and invasive infections. The medical impact of yeast pathogens depends on formation of biofilms: multicellular structures, protected from the environment. Cell adhesion is a prerequisite of biofilm formation. We investigated the adherence of wild and genetically modified *S. cerevisiae* strains, formation of solid–liquid interface biofilms and associated regulation. Planktonic and static cells of wild strain BRF adhered and formed biofilms in glucose-free medium. Tup1p and Cyc8p were key positive and negative regulators, respectively. Glucose caused increased Cyc8p levels and blocked cell adhesion. Even low glucose levels, comparable with levels in the blood, allowed biofilm dispersal and release of planktonic cells. Cyc8p could thus modulate cell adhesion in different niches, dependently on environmental glucose level, e.g., high-glucose blood versus low-glucose tissues in host organisms.

npj Biofilms and Microbiomes (2020)6:7 ; https://doi.org/10.1038/s41522-020-0118-1

INTRODUCTION

Fungal infections have become an increasing problem due to high associated mortality in immunosuppressed patients and limited availability of effective drug treatment, including an absence of biofilm-specific drugs. *Candida* and *Cryptococcus* spp. are major human opportunistic yeast pathogens. However, *Saccharomyces cerevisiae* (a close relative of *C. glabrata*) that is widely used in the food industry, has begun to be considered as an opportunistic pathogen in recent years, having been implicated in a variety of infections ranging from vaginitis and cutaneous infections, to systemic bloodstream and organ infections in immunocompromised patients.[1,2] *Saccharomyces* invasive infections are often clinically similar to invasive candidiasis.[3] Clinical *S. cerevisiae* strains (and strains of non-clinical origin with virulence features) are distinct from laboratory strains. They are often resistant to factors such as oxidative stress, copper and high temperature[4,5] and they can better survive in blood infection models. Clinical isolates often retain the ability to perform dimorphic switching between yeast form and pseudohyphae.[6] As *S. cerevisiae* usually has a low susceptibility to amphotericin B and azoles,[7] it can occupy niches, cleared of *C. albicans* and other yeasts in azole-treated patients.

Wild *S. cerevisiae* and *Candida* spp. adhere to different biotic and abiotic surfaces.[8,9] Adhesion efficiencies depend on surface properties of adherent cells, such as the presence of specific proteins, adhesins, mediating cell-cell or cell-biotic/abiotic surface interactions. Adhesion is a key step allowing cells to occupy new niches in the host, and to establish multi-layered biofilm structures, providing yeast cells with multiple protection[10,11] against the immune system and drug treatment. Hence, cell adhesion is an important factor in yeast virulence.[8] For example, *C. albicans* cells adhered to an abiotic dental prosthetic were significantly more resistant to a range of antifungals than planktonic cells.[12] Adhesins, mediating yeast cell adhesion to biotic (e.g., host tissues during infections) and/or abiotic (e.g., plastic) surfaces, include Epa adhesins of *C. glabrata*, Als adhesins of *C. albicans* and Flo11p adhesin of *S. cerevisiae*.[13–16] Flo11p is also involved in other processes, including invasive growth and formation of complex structure of colony biofilms.[9,17–19] Flo11p production is controlled by numerous factors that operate at different levels of Flo11p expression and function.[20] Cyc8p (Ssn6p) and Tup1p are conserved factors regulating numerous processes, mostly as a co-repressor complex.[21] In addition, Cyc8p and Tup1p antagonistically regulate Flo11p level and complexity of colony biofilms. Cyc8p represses the *FLO11* gene, preventing the formation of colony biofilms, whereas Tup1p antagonizes Cyc8p-mediated *FLO11* repression and, in addition, stabilizes the Flo11p protein by preventing its degradation.[22]

Here we show that Cyc8p negatively and Tup1p positively control adhesion of *S. cerevisiae* strains to plastic surfaces and subsequent formation of structured solid–liquid interface biofilm. The regulators influence adhesion of both shaken planktonic and static (sedimented) cells at any growth phase. In contrast to the wild strain, which is adhesive only in the absence of glucose, decreased level of Cyc8p also stimulates cell adhesion at high glucose concentrations. Glucose modulates cell adhesion and allows the release of planktonic cells from biofilms.

RESULTS

Adhesion to plastic varies in different *S. cerevisiae* strains

We first examined adhesion (the first step in biofilm formation) of non-isogenic strains BY4742 (a derivative of laboratory strain S288c), BRF (a wild strain) and domesticated strain BRS (Table 1), to polystyrene wells of microtiter plates. Two adhesion assays were performed. In the first assay, cells were inoculated directly into wells of microtiter plates and grown for 44 h (henceforth referred to as "static" cells) and then adherent cells were stained using crystal violet dye and quantified (Fig. 1a). In this assay, structured biofilm can develop (see below). In the second assay (Fig. 1b), planktonic cells were grown for 18 h in liquid medium with vigorous shaking (henceforth referred to as "planktonic" cells) and, after dilution to $A_{600} = 1$, were transferred to microtiter plate

[1]Faculty of Science, Charles University, BIOCEV, Prague, Czech Republic. [2]Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, BIOCEV, Prague, Czech Republic. [3]These authors contributed equally: Phu Van Nguyen, Vítězslav Plocek. ✉email: zdenap@natur.cuni.cz

Published in partnership with Nanyang Technological University

npj nature partner journals

wells. After 3 h, adherent cells were stained as above and quantified. In this assay only the initial phase of biofilm formation, cell adhesion, was investigated. In both assays, strains were grown either in complete respiratory medium (GM) or in fermentative glucose medium (YD) (Fig. 1).

Only wild strain BRF was significantly adhesive. Neither BY4742 nor the BRS strain adhered to the plastic surface in any of the conditions tested (Fig. 1). Adhesion efficiency of both static and planktonic BRF cells was much higher in glucose-free GM than in glucose-rich YD. Moderate adhesion of BRF static cells in YD (Fig. 1a) could be due to glucose consumption and thus its decreased level during prolonged cultivation. Adhesion of planktonic GM-pre-grown BRF cells was on average twice as high as that of static cells (compare Fig. 1a, b).

Table 1. Yeast strains.

Strains	Genotypes	References
BRF	*MATa/MATa*, wild strain isolate	34
BRF-Flo11p-GFP	*MATa/MATa, FLO11-GFP/FLO11*	41
BRS	*MATa/MATa*	34
BY4742	*MATa, his3Δ, leu2Δ, lys2Δ, ura3Δ*	Euroscarf.de
BRF-p_{TEF}-*CYC8*	*MATa/MATa, FLO11-GFP/FLO11, nat1-*p_{TEF1}*-CYC8/CYC8*	22
BRF-p_{GAL}-*CYC8*	*MATa/MATa, FLO11-GFP/FLO11, cyc8Δ::KanMX, nat1-*p_{GAL1}*-CYC8*	22
BRF-p_{GAL}-*TUP1*	*MATa/MATa, FLO11-GFP/FLO11, tup1Δ::KanMX, nat1-*p_{GAL1}*-TUP1*	22
BRF-p_{CUP}-*CYC8*	*MATa/MATa, FLO11-GFP/FLO11, cyc8Δ::KanMX, nat1-*p_{CUP1}*-CYC8*	This study
BRF-p_{CUP}-*TUP1*	*MATa/MATa, FLO11-GFP/FLO11, tup1Δ::KanMX, nat1-*p_{CUP1}*-TUP1*	This study
BRF-Cyc8p-GFP	*MATa/MATa CYC8-EGFP-kanMX/CYC8*	This study
BRF-Tup1p-GFP	*MATa/MATa TUP1-EGFP-kanMX/TUP1*	This study
BRF-p_{GAL}-*CYC8*-p_{CUP}-*TUP1*	*MATa/MATa, tup1Δ::loxP, cyc8Δ::loxP, KanMX-*p_{CUP1}*-TUP1, nat1-*p_{GAL1}*-CYC8*	22
BRF-p_{GAL}-*TUP1*-p_{CUP}-*CYC8*	*MATa/MATa, tup1Δ::loxP, cyc8Δ::loxP, nat1-*p_{GAL1}*-TUP1, KanMX-*p_{CUP1}*-CYC8*	22

Cyc8p and Tup1p conversely regulate cell adhesion

Next, we asked whether Cyc8p and Tup1p, which regulate formation of structured colony biofilms[22] are also involved in BRF cell adhesion to plastic. We therefore assayed the adhesion capability of BRF-derived strains with modified levels of Cyc8p and Tup1p (Table 1). Deletion of gene *CYC8* is lethal in the BRF strain, therefore we used strain BRF with one *CYC8* allele deleted and the second allele placed under the control of the p_{GAL} inducible promoter (BRF-p_{GAL}-*CYC8*) generating only a low basal level of *CYC8* expression in the absence of galactose. Similarly, in order to control the level of *TUP1* expression, we used strain BRF-p_{GAL}-*TUP1* with one *TUP1* allele deleted and the second controlled by p_{GAL}. As in the case of BRF-p_{GAL}-*CYC8*, the BRF-p_{GAL}-*TUP1* strain expressed only a low basal level of *TUP1* in the absence of galactose. We also used a strain, deleted in both *TUP1* alleles (BRF-*tup1*). Loss of expression or low basal expression of *TUP1*, or constitutive over-expression of *CYC8*, completely eliminated the adhesion capability of the BRF strain (Fig. 1; strains BRF-*tup1*, BRF-p_{GAL}-*TUP1*, and BRF-p_{TEF}-*CYC8*). In contrast, a decreased level of *CYC8* did not change adhesion capability of BRF in GM but greatly increased cell adhesion of both planktonic and static cells in high-glucose YD (Fig. 1; strain BRF-p_{GAL}-*CYC8*).

Expression of either *TUP1* or *CYC8* is inducible by galactose in BRF-p_{GAL}-*TUP1* and BRF-p_{GAL}-*CYC8*, respectively. Galactose, like glucose, is a fermentative sugar that increases growth rate, and could reduce cell adhesion, as it does other biofilm properties,[23] at high concentration. Therefore, we first estimated biomass yield and cell adhesion after 24 h cultivation in GM or YD with different galactose concentrations. As expected, increased BRF biomass yield in static cultivation correlated with galactose concentration in GM (Fig. 2a). BRF adhesion in GM increased slightly up to 0.05% galactose, possibly because of incomplete well surface coverage by cells in poor GM. Cells in 0.05–0.5% galactose exhibited uniform adhesion, independently of enhanced growth. Even the highest initial galactose concentration (1%) did not significantly decrease cell adhesion and so structured biofilm was formed (Fig. 2a). As expected, galactose did not influence BRF growth and adhesion in YD medium.

BRF-p_{GAL}-*TUP1* and BRF-p_{GAL}-*CYC8* biomass accrual in GM with galactose was only slightly lower than that of BRF, but adhesion of these two strains varied greatly, depending to galactose concentration: due to the induction of *TUP1* or *CYC8* expression (Fig. 2a). BRF-p_{GAL}-*TUP1* adhesion increased in GM as galactose

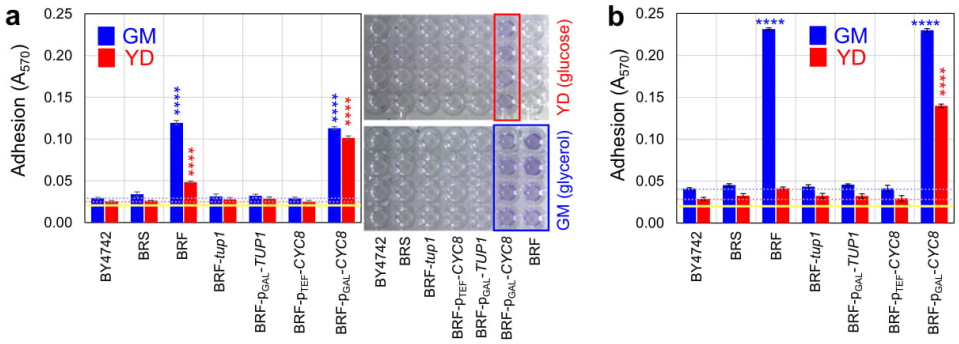


Fig. 1 Adhesion to plastic of wild, domesticated and laboratory strains and strains with changed level of Tup1p and Cyc8p regulators. Adhesion of 24-h old static (**a**) or 18-h old shaken (**b**) cultures in GM (glycerol) in blue or YD (glucose) in red. Picture of plastic microtiter plate used for **a** measurements is shown. Blue and red dotted lines indicate A_{570} value measured with non-adhesive laboratory strain BY4742. Yellow line indicates background absorbance (BA). Four distinct experimental replicates ($n = 4$) were measured for each strain and condition with results expressed as the means and s.d.'s. The statistical significance of the variation relative to the non-adherent BY4742 was determined using an unpaired two-tailed *t*-test and GraphPad Prism6 software; ****p-value < 0.0001.

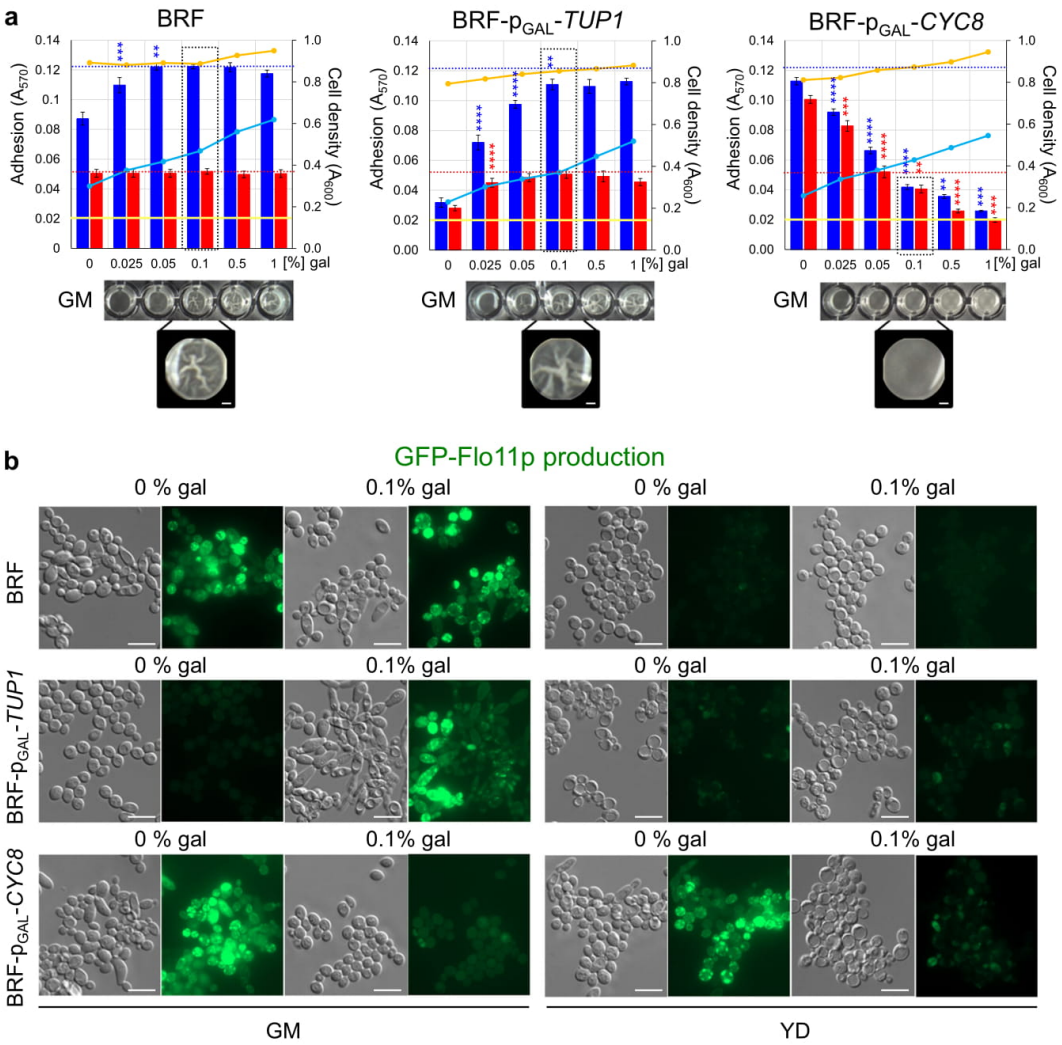


Fig. 2 Effect of galactose on adhesivity, biofilm formation and Flo11p-GFP production of static BRF, BRF-p$_{GAL}$-*TUP1* and BRF-p$_{GAL}$-*CYC8* cells in GM and YD. a Adhesivity of 24-h old static cultures in GM (blue bars) or YD (red bars) treated with 0–1% galactose (gal) was analyzed. Biomass yield (A_{600}) in GM (blue curve) and in YD (orange curve). Blue and red dotted lines indicate maximal A_{570} value measured with BRF. Yellow line indicates BA. Solid-liquid interface biofilm formed by BRF and galactose-induced BRF-p$_{GAL}$-*TUP1* in GM is shown at the bottom; bar, 1 mm. Four distinct experimental replicates ($n = 4$) were measured for each strain and condition with results expressed as the means and s.d.'s. The statistical significance of the variation between two succeeding galactose concentrations was determined using an unpaired two-tailed *t*-test and GraphPad Prism6 software; ****p-value < 0.0001, ***p-value < 0.001, and **p-value < 0.01. **b** Cell morphology (differential interference contrast, DIC) and presence of Flo11p-GFP in cells of respective strains grown in GM or YD and induced/non-induced by 0.1% galactose. Bar, 10 μm.

concentration ranged from 0 to 0.1% and was constant between 0.1 and 1% galactose. Wrinkled biofilms, visible to the naked eye, were formed over a range of 0.05–1% galactose. BRF-p$_{GAL}$-*CYC8* adhesion decreased over the entire concentration range (0.025–1% galactose). In contrast to GM, the presence of galactose in YD did not affect BRF background adhesion and only moderately increased adhesion of BRF-p$_{GAL}$-*TUP1*. On the other hand, adhesion of BRF-p$_{GAL}$-*CYC8* (non-induced) in YD was as high as in GM and was diminished by galactose induction of *CYC8* with the same concentration-dependent profile in both media. The p$_{GAL}$ promoter is inducible by galactose but also repressible by glucose, which together could result in a merely moderate increase in p$_{GAL}$-driven expression at high (2%) glucose concentration.[24] Therefore, we also assayed the effect of *TUP1* and *CYC8* induction on cell adhesion in GM and YD, using strains BRF-p$_{CUP}$-*TUP1* and BRF-p$_{CUP}$-*CYC8*, inducible by copper. The results (Supplementary Fig. 1) were comparable to those obtained by galactose induction, demonstrating that galactose induction is not deficient in the presence of glucose. To minimize the effect of cell accrual, 0.1% galactose was chosen for further experiments,

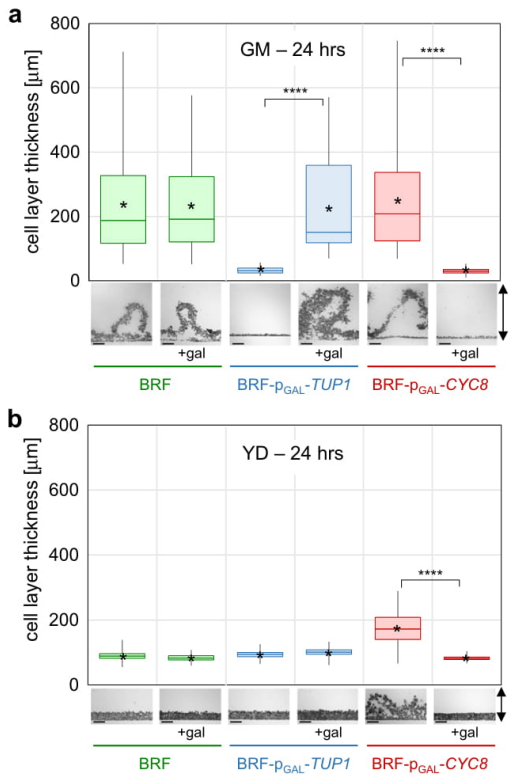


Fig. 3 Thickness of biofilms and non-adherent cell layers formed by BRF, BRF-p_{GAL}-*TUP1* and BRF-p_{GAL}-*CYC8* cells. Vertical cross-sections of 24-h-old static cultures in GM (**a**) or YD (**b**) without galactose or treated with 0.1% galactose (gal) were used for measurement of thickness of biofilms and non-adherent cell layers. The box plots show distribution of thickness measured at different positions (deep and shallow wrinkles) within biofilms and non-adherent cells (box extends from the 25th to 75th percentiles with center line representing the median and whiskers from Min to Max, asterisk indicates the mean). >200 different positions from 3 to 5 distinct cross-sections were measured for each plot using ImageJ. The statistical significance of the variation between galactose-treated and untreated samples was determined using an unpaired two-tailed *t*-test and GraphPad Prism6 software; ****p-value < 0.0001. Pictures at bottom show examples of cross-sections used for the measurement; black arrows indicate vertical direction of cross-sections. Bar, 100 µm.

producing uniform adhesion of BRF, maximal adhesion of BRF-p_{GAL}-*TUP1* and a drop in BRF-p_{GAL}-*CYC8* adhesion to below the BRF-adhesion threshold.

Next, we used strains BRF-p_{GAL}-*TUP1*-p_{CUP}-*CYC8* and BRF-p_{GAL}-*CYC8*-p_{CUP}-*TUP1* (Table 1), in which both *CYC8* and *TUP1* were controlled by inducible promoters to assay the balancing effect of Cyc8p and Tup1p levels on cell adhesion in 24-h-old static cultures in GM and YD (Supplementary Fig. 2). In GM medium, induction of *CYC8* and *TUP1* (using galactose plus Cu^{2+}), or of *TUP1* (by galactose or Cu^{2+}) in the absence of Cyc8p, lead to adhesion comparable with BRF adhesion. In contrast, induction of *CYC8* (by galactose or Cu^{2+}) in the absence of Tup1p eliminated adhesion almost completely. Adhesion of both strains without induction of either regulator (no galactose, no Cu^{2+}) was also strongly reduced, but was still higher than in the presence of high Cyc8p. In YD medium, low adhesion, comparable with BRF, was found when strains were induced by galactose and Cu^{2+} (high Tup1p and Cyc8p) as well as in the absence of their induction (low Tup1p and Cyc8p). Adhesion was almost completely eliminated when Cyc8p was high and Tup1p low (galactose or Cu^{2+} induction of only *CYC8*). When Cyc8p was low and Tup1p high (galactose or Cu^{2+} induction of only *TUP1*), adhesion increased as in the case of non-induced strain BRF-p_{GAL}-*CYC8*, in which *TUP1* is controlled by its native promoter (compare Supplementary Fig. 2 and Fig. 1a). Hence, increased adhesion in YD due to the absence of *CYC8* also requires the presence of Tup1p.

We further determined the correlation between strain adhesion and Flo11p expression. Cells of the BRF, BRF-p_{GAL}-*TUP1* and BRF-p_{GAL}-*CYC8* strains grown in GM or YD with 0 or 0.1% galactose in the wells were collected to estimate Flo11p-GFP presence (Fig. 2b). Flo11p-GFP level strictly correlated with strain adhesion ability, being high in BRF in GM (with or without galactose), BRF-p_{GAL}-*TUP1* in GM with galactose (induced *TUP1* expression) and BRF-p_{GAL}-*CYC8* in either GM or YD without galactose (diminished *CYC8* expression). In all other conditions, Flo11p-GFP fluorescence was negligible.

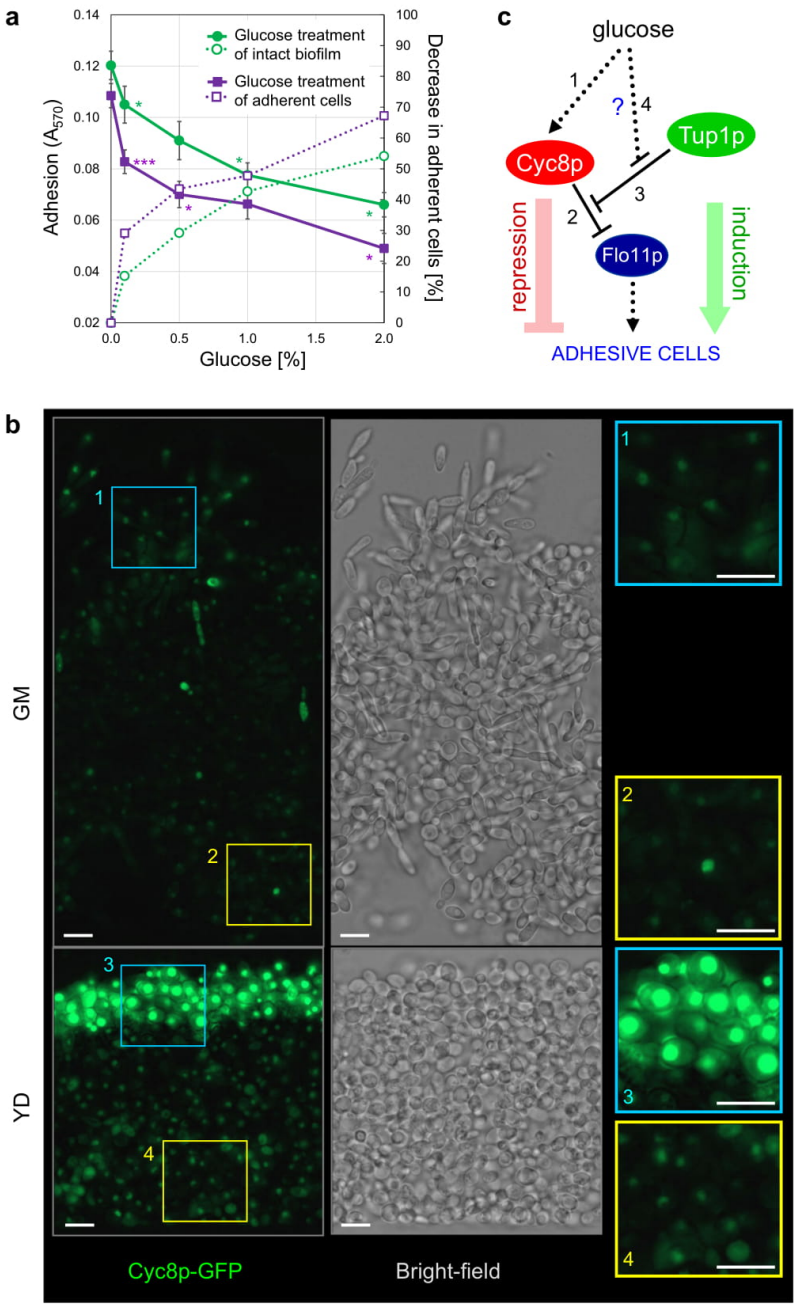
These data showed that Cyc8p and Tup1p conversely regulate cell adhesion involving the Flo11p adhesin, which is important in abiotic surface adhesion. Moreover, as with cell adhesion, Flo11p expression is strongly de-repressed in high glucose when Cyc8p level drops (YD without galactose) and Tup1p is present.

Cyc8p and Tup1p conversely regulate formation of structured biofilm

Next, we determined whether differences in adhesion mediated by Cyc8p and Tup1p, were reflected in formation of wrinkled solid–liquid interface biofilms. BRF, BRF-p_{GAL}-*TUP1* and BRF-p_{GAL}-*CYC8* strains were grown for 24 and 48 h in GM and YD with and without galactose and the minimum and maximum thickness of structured biofilm wrinkles and of non-adherent cell layers, respectively, were measured. In accordance with cell adhesion results, the formation of the three-dimensional structure of the wrinkled biofilm was also dependent on the presence of Tup1p and was inhibited by increased Cyc8p expression (Fig. 3). The thickness of 24-h-old biofilm formed by BRF, BRF-p_{GAL}-*TUP1* (induced by galactose) and BRF-p_{GAL}-*CYC8* (non-induced) was greater in GM medium (Fig. 3a) than that of biofilm formed by BRF-p_{GAL}-*CYC8* (non-induced) in YD (Fig. 3b). This indicates that low Cyc8p is sufficient to induce efficient adhesion and initiation of biofilm formation in the presence of glucose, while the development of fully structured biofilm probably requires other factors that are absent in high glucose conditions. Further cultivation did not significantly influence biofilm thickness as 48 h-old biofilms exhibited a thickness, similar to that of 24 h-old biofilms (compare Fig. 3 and Supplementary Fig. 3).

Glucose disrupts biofilm and releases adhered cells

Intriguingly, decreased level of Cyc8p greatly increased cell adherence and biofilm formation in the presence of glucose (in YD). We therefore tested the hypothesis that level of glucose could modulate release of biofilm cells. Different concentrations of glucose were applied for 4 h either to intact biofilm of strain BRF (formed during 44 h static cultivation in GM) or to the same biofilm, but after gentle removal of liquid medium with non-adherent cells. In both cases, glucose caused significant biofilm disruption and release of adherent cells (Fig. 4a). Even a concentration of 0.1% glucose decreased adhesion by ~15% and ~30%, respectively. Two percent glucose, added after removal of the medium, caused release of almost 70% of adherent cells (Fig. 4a).



Glucose increases amount of Cyc8p in cell nuclei

To further clarify the relationship between glucose and Cyc8p function, we constructed BRF strains with either Cyc8p or Tup1p tagged with GFP (strains BRF-Cyc8p-GFP and BRF-Tup1p-GFP, Table 1). Both Cyc8p-GFP and Tup1p-GFP localize to the nucleus. We then used these strains to estimate levels of Cyc8p and Tup1p in non-adherent static cells grown in the presence of glucose (YD) and in biofilms grown in the absence of glucose (GM). Biofilms and non-adherent cells were grown in microtiter plates for 24 h and vertical cross-sections analyzed by fluorescence and bright-field microscopy. The level of Cyc8p-GFP was significantly higher in non-adherent cell layers in YD, than in biofilms in GM (Fig. 4b).

Fig. 4 Role of glucose in Cyc8p and Tup1p regulation of yeast adhesion and biofilm formation: experimental data and scheme. a Glucose was added to the intact biofilm in GM (green) or to the adherent cells after medium removal (violet). Solid lines, cell adhesion after glucose treatment; dotted lines, decrease in percentage of adhesive cells due to glucose treatment. Experiments were conducted in quadruplicate (distinct samples, $n = 4$) with results expressed as the means and s.d.'s. The statistical significance of the variation between two succeeding galactose concentrations was determined using an unpaired two-tailed t test and GraphPad Prism6 software; ***p-value < 0.001 and *p-value < 0.05. **b** Vertical cross-sections of 24-h-old static cultures of BRF-Cyc8p-GFP strain in GM or YD; Cyc8p-GFP fluorescence in green, cells are visible in bright-field. Cells in Insets "1–4" are shown at higher magnification, indicating distribution and intensity of fluorescence of Cyc8p-GFP in different biofilm/non-adherent cell regions. Bar, 10 µm. A representative experiment of three ($n = 3$) independent experiments is shown. **c** Model of glucose function: Glucose induces Cyc8p expression/function "1", subsequently Cyc8p represses *FLO11* expression "2" and cell adhesion is blocked. This effect would be enhanced if glucose also negatively affects Tup1p function "4". In glucose absence, Cyc8p level is decreased and its function is inhibited via Tup1p "3" as described.[22] Subsequently Flo11p is produced and contributes to cell adhesion. Arrow, induction; blunt line, repression. Dotted line, additional proteins may participate in the effect. Light-color blunt line (red) and arrow (green) indicate effects of the regulators on cell adhesion.

In addition, the Cyc8p-GFP level was high in nuclei of surface cell layers, in particular in YD, and lower in internal regions. This may be because the glucose had already been spent in lower cells that were not in direct contact with the medium. Hence, the major difference in Cyc8p level between biofilms and non-adherent cell layers concerns surface areas. In contrast to Cyc8p, no visible difference in Tup1p-GFP level was observed between biofilms and non-adherent cell layers (Supplementary Fig. 4).

Tup1p and Cyc8p regulate adhesion of both planktonic and static cells independently of growth phase

Next we asked whether cell adhesion is regulated by Tup1p and Cyc8p identically or differently, depending on the cell state, such as different cell growth phases (exponential, diauxic, and stationary phase) or different lifestyle (static versus planktonic cells). We also tested the speed of the cellular response (cell adhesion or release) to increased Tup1p or Cyc8p levels by treating cells with inducer (galactose) for 6 or 10 h.

In the "static" setup, BRF-p_{GAL}-*TUP1*, BRF-p_{GAL}-*CYC8*, and BRF were grown in GM or YD in wells, *TUP1* or *CYC8* expression was induced by galactose at specific time-points for either 6 (Fig. 5d–f) or 10 h (Supplementary Fig. 5d–f) and adhesion analyzed. In parallel, we measured growth curves of all strains (Fig. 5a–c and Supplementary Fig. 5a–c). Adhesion of BRF in GM reached a similar level, independently of galactose presence and also of cell density, which is higher in galactose-treated cultures. The BRF adhesion maximum in GM was reached at 17 h at a cell density, corresponding to A_{600} ~ 0.4 and it remained constant later (Fig. 5d), despite continued growth of the strain (Fig. 5a). As expected, BRF-p_{GAL}-*TUP1* with low *TUP1* expression exhibited only basal adhesion in GM. Induction of *TUP1* expression by 6-h-galactose treatment at any time-point was not sufficient to induce the maximal level adhesion reached by BRF (compare Fig. 5d, e). As with BRF, adhesion of younger BRF-p_{GAL}-*TUP1* populations was slightly lower than that of older ones (Fig. 5e). Adhesion, similar to that of BRF, was reached only after 10-h induction of *TUP1* expression (Supplementary Fig. 5e). Adhesion of BRF-p_{GAL}-*CYC8* with low *CYC8* expression in GM (Fig. 5f and Supplementary Fig. 5f) resembled that of BRF (Fig. 5d and Supplementary Fig. 5d). Induction of *CYC8* expression by galactose diminished BRF-p_{GAL}-*CYC8* adhesion almost independently of treatment period (Fig. 5f and Supplementary Fig. 5f). As expected, in YD, BRF exhibited only basal adhesion, independently of galactose treatment (Fig. 5d and Supplementary Fig. 5d). A low level of Tup1p in BRF-p_{GAL}-*TUP1* caused a slight decrease in this basal adhesion in YD, which reverted back after galactose induction of *TUP1* (Fig. 5e and Supplementary Fig. 5e). A low level of Cyc8p always increased adhesion efficiency in YD almost to the same level as in GM and galactose induction of *CYC8* diminished adhesion similarly in YD and GM (Fig. 5f and Supplementary Fig. 5f).

In the "planktonic" setup (Fig. 6 and Supplementary Fig. 6), the same number of planktonic cells was applied to the wells in each time-point and thus the adhesion efficiency was not influenced by cell numbers in wells. In contrast to static cultures, adhesion efficiency was completely independent of cell growth phase and reached highest levels under conditions, permitting adhesion (Fig. 6d–f and Supplementary Fig. 6d–f). Adhesion of planktonic BRF cells was independent of galactose presence (similarly to static cultures), being high in GM and basal in YD (Fig. 6d and Supplementary Fig. 6d). BRF-p_{GAL}-*TUP1* adhesion was basal in GM and YD and increased only in GM due to galactose-mediated *TUP1* induction, reaching higher values after 10 than 6 h of galactose treatment (Fig. 6e and Supplementary Fig. 6e). BRF-p_{GAL}-*CYC8* adhesion was comparable with BRF in GM but, again, significantly higher in YD (Fig. 6f and Supplementary Fig. 6f). In contrast to static cells, 6-h-galactose induction of *CYC8* led to a smaller decrease in adhesiveness (Fig. 6f) than 10 h-treatment (Supplementary Fig. 6f) and neither reduced adhesion to BRF basal level (compare Fig. 6d, f and Supplementary Fig. 6f, d).

In summary, these data indicate that Cyc8p and Tup1p mediated regulation is robust, functioning similarly in static and planktonic cells and being only moderately influenced by cell culture growth phase. In both static and planktonic cultivation, the effect of Cyc8p induction is similar after 6 and 10 h and is thus quicker than that of Tup1p which is higher after 10 than after 6 h. However, the decrease in adhesion, compared with BRF, is higher in static than in planktonic cells upon Cyc8p induction. These observations are consistent with other data indicating that an increase in Cyc8p level causes release of adherent cells from already formed biofilms.

DISCUSSION

We have shown that adhesion of wild strain BRF to an abiotic solid surface, the related Flo11p expression, and the formation of structured biofilm at a solid–liquid interface, are regulated conversely by Tup1p and Cyc8p. Furthermore, we have revealed that Tup1p-induced adhesion is efficient in glucose-free conditions, whereas Tup1p presence is necessary but not sufficient to induce adhesion of cells grown in the presence of glucose. In contrast, Cyc8p-mediated repression of adhesion is efficient and comparable in both conditions, thus demonstrating that Cyc8p is an important player in glucose-regulated cell adhesion and biofilm formation.

Adhesion of both static and planktonic cells is regulated by Cyc8p and Tup1p, with only slight differences. Relatively homogeneous planktonic cells adhered independently of growth phase and with higher efficiency than their static counterparts. Tup1p-mediated adhesion efficiency slightly increased in older static cultivations. This indicates that more adhesive and less adhesive cells are present near to the plastic surface in static cultivations and that the frequency of more adhesive cells slightly increases as the biofilm develops. Static biofilm cells also respond faster than planktonic cells to an increase in Cyc8p by massive release from

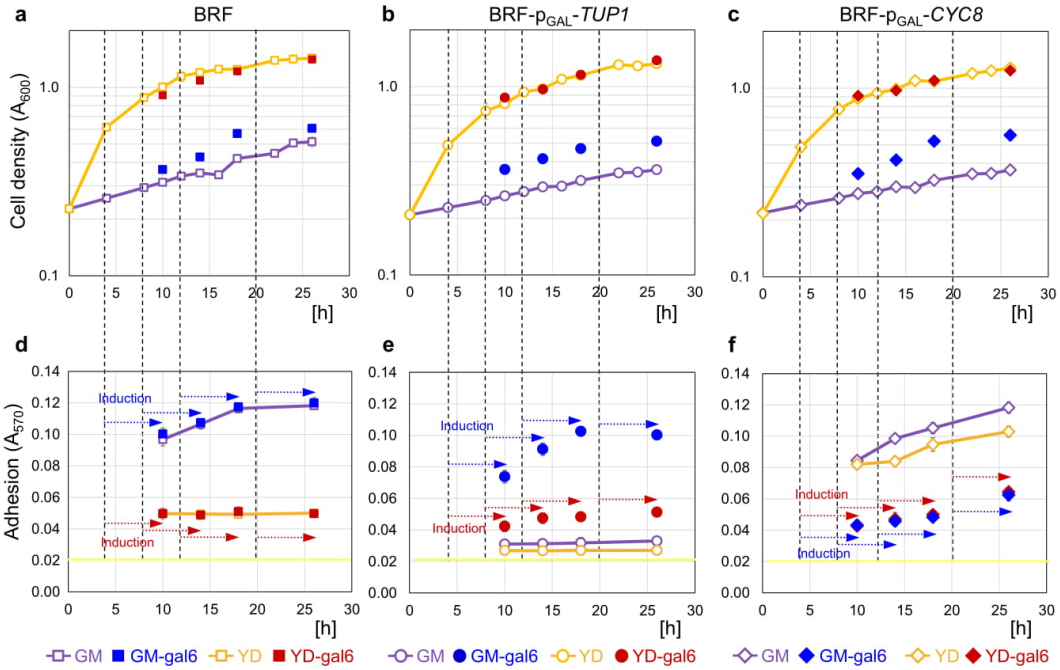


Fig. 5 Effect of Tup1p or Cyc8p induction on adhesivity of cells in different growth phases of static cultures. a–c Strain growth curves in GM and YD. gal6, galactose was added 6 h before measurement of the biomass (A_{600}). **d–f** Adhesivity of the strains without induction and after 6 h of galactose induction. Arrows (**d–f**) indicate interval of galactose presence in relation to time-points (indicated by dashed lines), in which galactose was added. Yellow line indicates BA. Experiments were conducted in quadruplicate (distinct samples, $n = 4$) with results expressed as the means and s.d.'s.

the plastic surface. Cell response to *TUP1* induction was slower, but still quicker in static than in planktonic cells.

BRF cell adhesion and biofilm formation is strictly dependent on medium composition, being high in the absence of glucose ("permissive") and low in high glucose ("non-permissive") conditions. Tup1p is a key activator of cell adhesion under permissive conditions, but even increased Tup1p levels had negligible effect under non-permissive conditions when Cyc8p was expressed from its native promoter. In contrast, increased Cyc8p level seems to exert a strong effect under non-permissive conditions, counteracting the Tup1p and Flo11p functions, potentially via mechanisms, described recently.[22] Glucose may thus regulate Cyc8p level and/or repressor activity (Fig. 4c). Several factors participating in glucose regulation, such as Nrg1p, Mig1p, and Sfl1p, were shown to interact with, and influence the function of, the Cyc8p-Tup1p complex.[11,25,26] However, neither of these factors is involved in antagonistic Cyc8p and Tup1p regulations.[22] Little information is available on environmental regulation of the *CYC8* gene at the transcription level, but genome-wide transcriptomic screens showed the level of *CYC8* mRNA to be ~2.4 times higher after 15 min treatment in 2% glucose than in 0.05% glucose[27] and *CYC8* mRNA level gradually decreased during prolonged cultivation in glucose YPD medium,[28] possibly due to glucose consumption. Here we show that the level of Cyc8p-GFP is much higher in nuclei of cells at surface layers of non-adherent cells grown in glucose-rich YD medium than in nuclei of cells in biofilms grown in glucose-free GM. Altogether, these data support the hypothesis that Cyc8p level itself is regulated by glucose (Fig. 4c), though the existence of a specific, as yet unidentified, factor influencing repressive Cyc8p function, cannot be excluded. Cyc8p level is affected by glucose mainly in surface cells, which are in contact with the fluid (medium). This is in agreement with the observed efficient release of solid–liquid interface biofilm upon the addition of glucose. In principle, in this way, whole biofilms and/or individual planktonic cells could be efficiently released from solid/semi-solid supports.

Involvement of a glucose-responsive factor in adhesion and biofilm formation could play an important role in yeast virulence and in systemic and biofilm infections (Fig. 7). When a yeast cell settles in a low-glucose niche (tissue), the level/function of Cyc8p is lowered, allowing Tup1p to mediate cell adhesion and biofilm development (Fig. 7, "Biofilm 1"). Contact of biofilms with higher glucose environments (such as blood/plasma) causes an increase in Cyc8p level/function and subsequent decrease in adhesion and release of free planktonic cells. These cells may then be dispersed until they reach another low glucose niche (another tissue), in which Cyc8p level/function is again repressed, allowing yeast to adhere and form biofilm (Fig. 7, "Biofilm 2") therein. By this mechanism, planktonic cells and biofilms are able to spread and survive in a heterogeneous environment, such as a host organism. As even 0.1% (=~5.5 mM) glucose concentration is sufficient to release 15–30% of cells from the biofilm (Fig. 4a), our model is relevant under physiological conditions, since normal blood glucose concentration is below 7.8 mM (2 h post-prandial).[29] Transient glycosuria in diabetics or some pregnant women may also cause yeast biofilm to spread to the genitourinary tract.

It has been shown that, in addition to anticancer treated immunocompromised patients, diabetic patients represent another group, at high-risk of invasive fungal infections[30] and examples of *S. cerevisiae* infection have been reported in these patients.[1] An increase in glucose level has been detected in blood and other body niches such as urine, intestinal fluid, mucus,

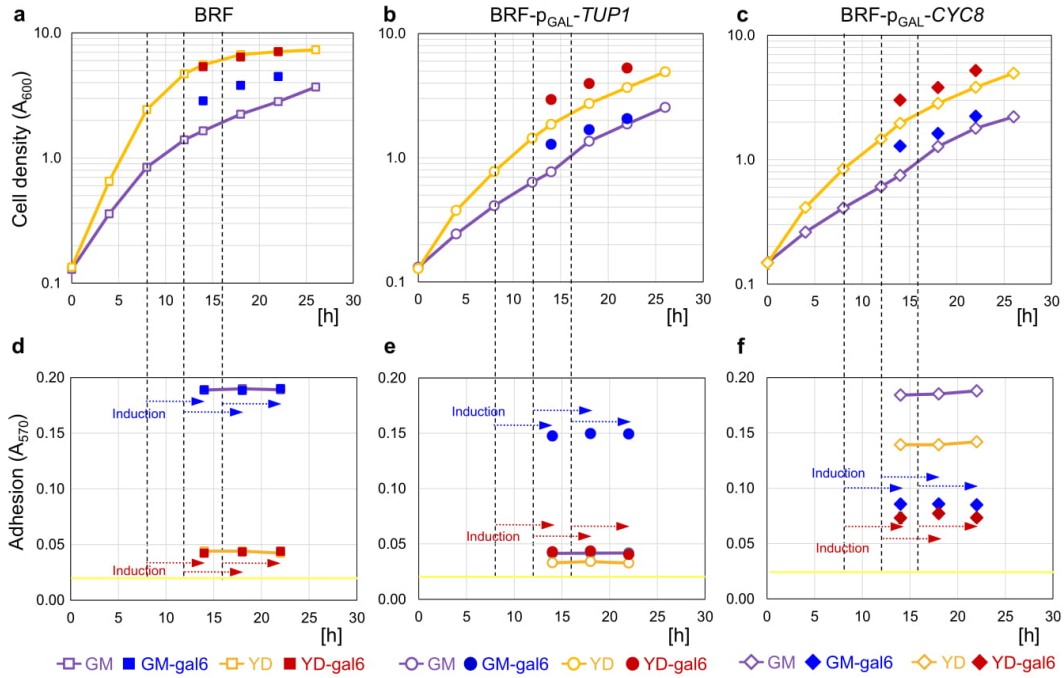


Fig. 6 Effect of Tup1p or Cyc8p induction on adhesivity of planktonic cells from different growth phases of shaken cultures. a–c Strain growth curves in GM and YD. gal6, galactose was added 6 h before measurement of the biomass (A_{600}). **d–f** Adhesivity of the strains without induction and after 6 h of galactose induction. Arrows (**d–f**) indicate period of galactose treatment in relation to time-points (indicated by dashed lines) in which galactose was added. Yellow line indicates BA. Experiments were conducted in quadruplicate (distinct samples, $n = 4$) with results expressed as the means and s.d.'s.

sweat/perspiration and saliva[31] and is a known risk-increasing factor in fungal infections for two main reasons: Increased glucose benefits yeast cell growth and decreases the effect of some antifungal drugs.[30,32] Here we speculate about a third glucose-related risk—increase of glucose in some niches could lead to release of adherent cells and their dispersal within the organism, potentially followed by development of new biofilms as new outbreaks of infection. We show that Cyc8p is a key factor in this process and, together with Cyc8p and Tup1p mediated anti-regulation, is effective in both adherent and planktonic cells and mostly independent of growth phase. We also proved that an increase in glucose concentration causes release of adherent cells from complex biofilm structures. Both Cyc8p and Tup1p are conserved among yeast and information concerning their function in *Candida* spp. cell adhesion is scarce. One indication of a positive role for Tup1p in adhesion of *C. albicans* comes from findings that a *tup1*Δ strain forms only pseudohyphae with reduced adhesion to keratinocytes.[33] Hence, besides Cyc8p and Tup1p being potential risk factors and therapeutic targets in (so far) less frequent *S. cerevisiae* infections, Cyc8p and Tup1p orthologues may be involved in adhesion, biofilm formation and cell release in *Candida* spp., in particular *C. glabrata*, a close relative of *S. cerevisiae*.

METHODS

Yeast strains and media

Strains used in this study (Table 1) were derived from wild strain BRF[18,34] from the collection of the Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences (collection number CCY 21-4-97). Strain BY4742 was obtained from Euroscarf (collection number Y10000). For adhesion assays, strains were grown in GM (3% glycerol, 1% yeast extract) or YD (2% glucose, 1% yeast extract) media without any additives, or supplemented with galactose and/or Cu^{2+} ($CuSO_4$) in final concentration as described in the Result section.

Strain constructions

CYC8 and *TUP1* gene knock-outs were performed by transforming the cells with deletion cassettes generated by PCR from plasmid pUG6.[35] Strains with C terminal GFP fusions were constructed using a GFP-KanMX integrative cassette, amplified by PCR from plasmid pKT127.[36] Strains expressing *TUP1* or *CYC8* under the control of inducible promoter p_{CUP} were constructed by integration of p_{CUP1}-natNT2 cassettes amplified from the pYM-N2 plasmid.[37] Yeast cells were transformed using a standard lithium acetate/polyethylene glycol method.[38] Positive transformants were selected on GMA (GM, 2% agar) supplemented with G418 (200 mg/l) or nourseothricin (100 mg/l). Correct genomic integration of cassettes was verified by PCR using specific primers and by sequencing. The primers and plasmids are listed in Supplementary Table 1.

Cell cultivation for adhesion assays

Biofilm cultures (static cells). Cells from overnight cultures in GM or YD (28 °C, with shaking) were harvested. Biomass was inoculated into fresh GM or YD, respectively, to a concentration of 0.3 mg wet weight/ml). For biofilm cultivation, 150 µl of cell suspension was pipetted into each well of a polystyrene 96 well microtiter plate V400917 from GAMA group Inc., CZ (four independent replicates per strain and condition) and incubated at 28 °C. If needed, galactose and/or Cu^{2+} ($CuSO_4$) was added to the required final concentration. Cell absorbance (A_{600}) was determined at indicated time-points. In parallel, cell adhesion was determined.

Shaken cultures (planktonic cells): 10 ml of cell suspension was cultivated at 28 °C in an Erlenmeyer flask with vigorous shaking (150 rpm) and cell density determined as A_{600}. If needed, galactose and/

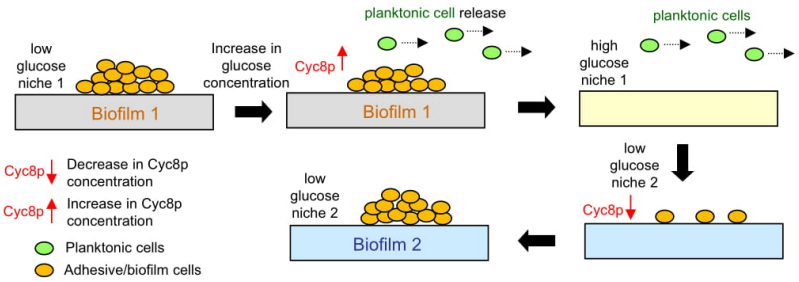


Fig. 7 Model of role of glucose in formation of solid–liquid interface biofilm. Level of environmental glucose can regulate switch between cell adhesion/biofilm formation and release of planktonic cells in structured heterogeneous environment (organism). Biofilm 1, primary biofilm from which planktonic cells may be released when glucose concentration increases. Released cells may then settle in new low-glucose niches, in which they form secondary biofilm (Biofilm 2).

or Cu^{2+} ($CuSO_4$) was added to the required final concentration. At appropriate time-points, cells were harvested, washed and resuspended in water to $A_{600} = 1$. Then 150 µl of the cell suspension (approximately $1–3 \times 10^7$ cells/ml) was pipetted into the wells of a 96 well microtiter plate (four independent replicates per strain and condition) and incubated at 28 °C. Adhesion was determined after 3 h incubation.

Adhesion assays

The adhesion assay[9,39] was performed with modifications. The liquid (medium or water) was removed and the microtiter plates thoroughly washed by submerging three times in water. One hundred and fifty microliter of 1% crystal violet dye was added to each well and plates were incubated at room temperature with gentle shaking. After 15 min, the dye solution was removed and the plates were washed three times with distilled water. Afterwards, 150 µl of 95% ethanol was added to each well to elute the dye from attached cells. Hundred microliter of the crystal violet eluate from each well was transferred to a new microtiter plate and the absorbance (A_{570}) measured by Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek). A_{570} value reflects the number of adherent cells and was taken as a measure of relative efficiency of adhesion. In control measurements, the complete procedure was performed in a microtiter plate without cells. The measured value, 0.02 was indicated in the graphs as the background absorbance (BA).

Release of adherent cells by glucose

Glucose was added (i) directly to the well containing the intact biofilm in GM or (ii) to the biofilm after removal of GM with non-adhered cells and washing, to desired final concentration. After 4 h incubation, all non-adherent cells were removed by washing and adhesive cells quantified as above.

Biofilm imaging and cell microscopy

Images of biofilms in wells of microtiter plate were captured in incident and/or transmitted light. A ProgRes® CT3 CMOS camera with a Navitar objective and NIS Elements software (Laboratory Imaging, s.r.o, Prague, CZ) were used. For thickness analyses of biofilms and non-adherent cell layers and analyses of Tup1p-GFP and Cyc8p-GFP expression, biofilms and non-adherent cell layers were fixed with 4% agarose and sectioned using a Leica VT1200S vibrating microtome.[40] Re-suspended cells or sections of biofilms/non-adherent cell layers were observed using Carl Zeiss Axio Observer.Z1 fluorescence microscope equipped with Axiocam 506 and a C-Apochromat 10×/0.45 W objective (for thickness analyses) or a C-Apochromat 63×/1.20 W (for GFP expression) using ZEN 2012 (blue edition) software. Filter sets for GFP (excitation 450–490 nm; emission 500–550 nm), differential interference contrast (DIC) or bright field were used. The thickness of biofilms/non-adherent cell layers was measured from images using ImageJ (version 1.52a).

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

The data that support the findings of this study are included in the article, its supplementary information files, or are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 16 August 2019; Accepted: 29 January 2020;
Published online: 13 February 2020

REFERENCES

1. Enache-Angoulvant, A. & Hennequin, C. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 1559–1568 (2005).
2. Perez-Torrado, R. & Querol, A. Opportunistic strains of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential risk sold in food products. *Front. Microbiol.* **6**, 1522 (2015).
3. Sobel, J. D., Vazquez, J., Lynch, M., Meriwether, C. & Zervos, M. J. Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clin. Infect. Dis.* **16**, 93–99 (1993).
4. Diezmann, S. & Dietrich, F. S. *Saccharomyces cerevisiae*: population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild isolates. *PLoS ONE* **4**, e5317 (2009).
5. Diezmann, S. & Dietrich, F. S. Oxidative stress survival in a clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolate is influenced by a major quantitative trait nucleotide. *Genetics* **188**, 709–722 (2011).
6. Klingberg, T. D., Lesnik, U., Arneborg, N., Raspor, P. & Jespersen, L. Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits. *FEMS Yeast Res.* **8**, 631–640 (2008).
7. Barchiesi, F. et al. In vitro activity of five antifungal agents against clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Med. Mycol.* **36**, 437–440 (1998).
8. de Groot, P. W., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M. & Chauhan, N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryot. Cell* **12**, 470–481 (2013).
9. Reynolds, T. B. & Fink, G. R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**, 878–881 (2001).
10. Palkova, Z. & Vachova, L. Yeast cell differentiation: Lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts. *Semin Cell Dev. Biol.* **57**, 110–119 (2016).
11. Verstrepen, K. J. & Klis, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* **60**, 5–15 (2006).
12. Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A. & Andes, D. R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.* **8**, 1325–1337 (2013).
13. Cormack, B. P., Ghori, N. & Falkow, S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**, 578–582 (1999).
14. Guo, B., Styles, C. A., Feng, Q. & Fink, G. R. A Saccharomyces gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl Acad. Sci.* **97**, 12158–12163 (2000).
15. Hoyer, L. L., Green, C. B., Oh, S. H. & Zhao, X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family-a sticky pursuit. *Med. Mycol.* **46**, 1–15 (2008).
16. Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L. & Cormack, B. P. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 378–384 (2005).
17. Lambrechts, M. G., Bauer, F. F., Marmur, J. & Pretorius, I. S. Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci.* **93**, 8419–8424 (1996).

18. Vachova, L. et al. Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *J. Cell Biol.* **194**, 679–687 (2011).
19. Vopalenska, I., St'ovicek, V., Janderova, B., Vachova, L. & Palkova, Z. Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environ. Microbiol.* **12**, 264–277 (2010).
20. Bojsen, R. K., Andersen, K. S. & Regenberg, B. *Saccharomyces cerevisiae*—a model to uncover molecular mechanisms for yeast biofilm biology. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 169–182 (2012).
21. Smith, R. L. & Johnson, A. D. Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 325–330 (2000).
22. Nguyen, P. V., Hlavacek, O., Marsikova, J., Vachova, L. & Palkova, Z. Cyc8p and Tup1p transcription regulators antagonistically regulate Flo11p expression and complexity of yeast colony biofilms. *PLoS Genet.* **14**, e1007495 (2018).
23. Granek, J. A. & Magwene, P. M. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genet.* **6**, e1000823 (2010).
24. Meurer, M., Chevyreva, V., Cerulus, B. & Knop, M. The regulatable MAL32 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*: characteristics and tools to facilitate its use. *Yeast* **34**, 39–49 (2017).
25. Conlan, R. S. & Tzamarias, D. Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J. Mol. Biol.* **309**, 1007–1015 (2001).
26. Wilson, W. A., Hawley, S. A. & Hardie, D. G. Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol.* **6**, 1426–1434 (1996).
27. Casamayor, A. et al. The role of the Snf1 kinase in the adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to alkaline pH stress. *Biochem. J.* **444**, 39–49 (2012).
28. Gasch, A. P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241–4257 (2000).
29. Wile, D. & Wilding, J. P. H. in *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. 3rd edn, 273–304 (Elsevier, 2014).
30. Rodrigues, C. F., Rodrigues, M. E. & Henriques, M. *Candida* sp. infections in patients with diabetes mellitus. *J. Clin. Med.* **8**, 76 (2019).
31. Bruen, D., Delaney, C., Florea, L. & Diamond, D. Glucose sensing for diabetes monitoring: recent developments. *Sensors* **17**, 1866 (2017).
32. Mandal, S. M. et al. Glucose directly promotes antifungal resistance in the fungal pathogen, *Candida* spp. *J. Biol. Chem.* **289**, 25468–25473 (2014).
33. Villar, C. C., Kashleva, H. & Dongari-Bagtzoglou, A. Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cells. *Oral Microbiol. Immun.* **19**, 262–269 (2004).
34. Kuthan, M. et al. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol. Microbiol.* **47**, 745–754 (2003).
35. Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. & Hegemann, J. H. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2519–2524 (1996).
36. Sheff, M. A. & Thorn, K. S. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**, 661–670 (2004).
37. Janke, C. et al. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–962 (2004).
38. Gietz, R. D. & Woods, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/ polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**, 87–96 (2002).
39. Mowat, E., Butcher, J., Lang, S., Williams, C. & Ramage, G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1205–1212 (2007).
40. Cap, M., Stepanek, L., Harant, K., Vachova, L. & Palkova, Z. Cell differentiation within a yeast colony: metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Mol. Cell* **46**, 436–448 (2012).
41. Stovicek, V., Vachova, L., Begany, M., Wilkinson, D. & Palkova, Z. Global changes in gene expression associated with phenotypic switching of wild yeast. *BMC Genom.* **15**, 136 (2014).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Derek Wilkinson for proofreading of the manuscript. This study was supported by Czech Science Foundation 19-11384S, by LQ1604 NPU II provided by MEYS and by RVO 61388971; research was performed in BIOCEV supported by CZ.1.05/1.1.00/02.0109 provided by ERDF and MEYS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Z.P. and L.V. devised the study and experimental design. P.N. and V.P. conducted the experiments and processed the data. Z.P. and L.V. analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript with contribution by P.N. and V.P. All authors read and approved the final manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41522-020-0118-1.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Z.P.

Reprints and permission information is available at http://www.nature.com/reprints

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020

Supplementary information

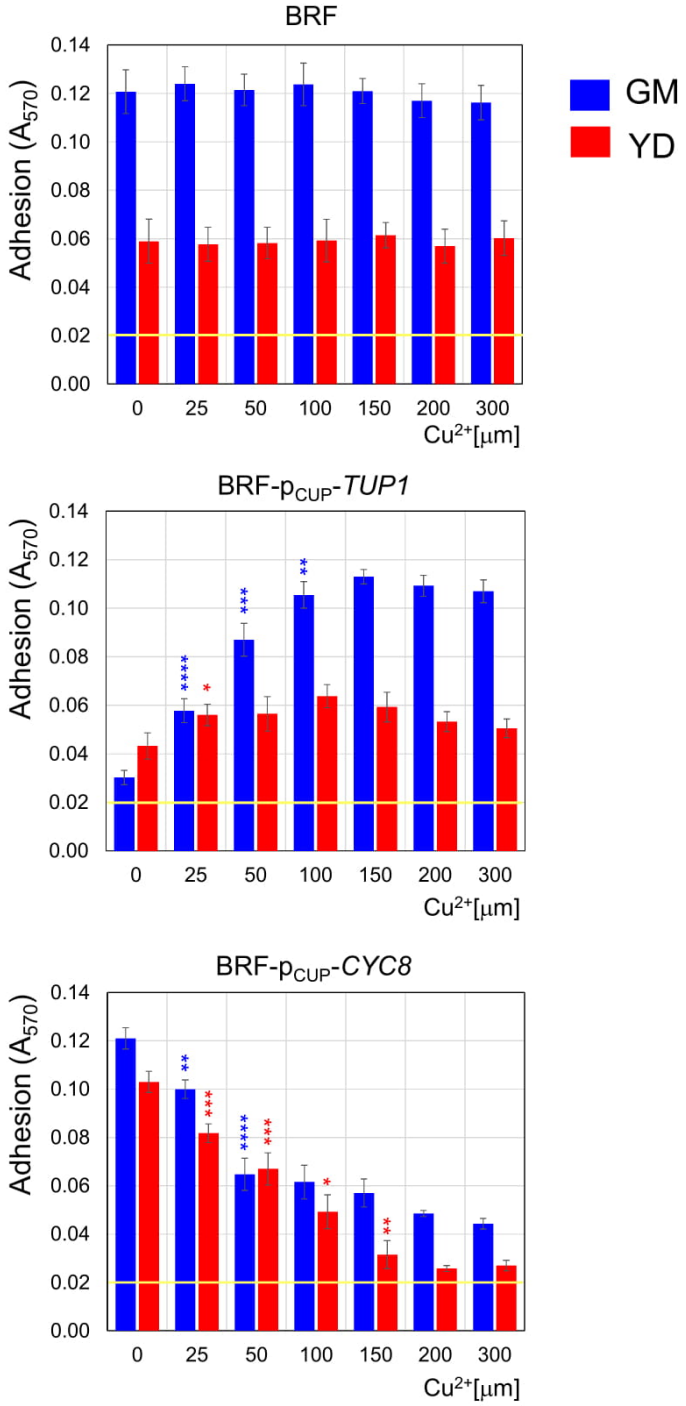
Supplementary Tab. 1. Lists of the plasmids and primers.

Plasmid	**Application**	**Reference**
pUG6	deletion cassette (kanMX marker)	[1]
pYM-N1	P_{CUP1} cassette	[2]
pKT127	C-terminal GFP fusion	[3]

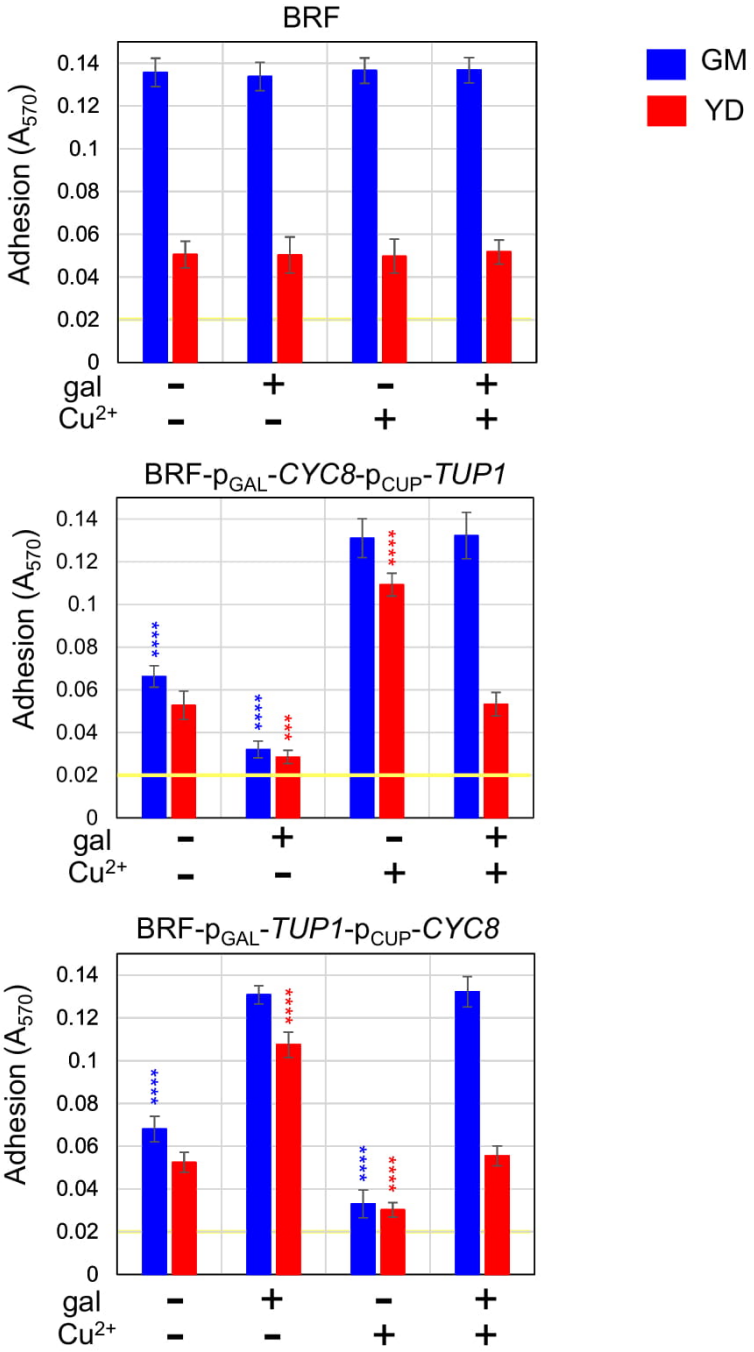
Primer	**Sequence**	**Purpose**
CYC8-del-forward	AACAACAACAAACAAAACACGACTGGAAAAAAAAAATTAGGAAAACAGCTGA AGCTTCGTACGC	deletion of *CYC8* gene
CYC8-del-reverse	GATTATAAATTAGTAGATTAATTTTTTGAATGCAAACTTTGCATAGGCCACTAGT GGATCTG	deletion of *CYC8* gene
TUP1-del-forward	TGATAAGCAGGGGAAGAAAGAAATCAGCTTTCCATCCAAACCAATCAGCTGAA GCTTCGTACGC	deletion of *TUP1* gene
TUP1-del-reverse	GTTTAGTTAGTTACATTTGTAAAGTGTTCCTTTTGTGTTCTGTTCGCATAGGCCAC TAGTGGATCTG	deletion of *TUP1* gene
CUP1_CYC8 forward	AACAACAAACAAAACACGACTGGAAAAAAAAAATTAGGAAAAATGCGTACGCT GCAGGTCGAC	Insertion of p_{CUP} in front of *CYC8* coding sequence
CUP1_CYC8-reverse	CTGTTGAGCGGGTTGTTCCATTATTGTTTGTTCACCGCCCGGATTCATCGATGAA TTCTCTGTCG	Insertion of p_{CUP} in front of *CYC8* coding sequence
CUP1_TUP1-forward	TAAGCAGGGGAAGAAAGAAATCAGCTTTCCATCCAAACCAATATGCGTACGCTG CAGGTCGAC	Insertion of p_{CUP} in front of *TUP1* coding sequence
CUP1_TUP1-reverse	GCTCATTCAGCTTATTCTGCGTATTCGAAACGCTGGCAGTCATCGATGAATTCTC TGTCG	Insertion of p_{CUP} in front of *TUP1* coding sequence
CYC8-EGFP-forward	AAAATGTAGTAAGGCAAGTGGAAGAAGATGAAAACTACGACGAC GGTGACGGTGCTGGTTTA	C-terminal fusion of *CYC8* with GFP
CYC8-EGFP-reverse	TCTCGTTGATTATAAATTAGTAGATTAATTTTTTGAATGCAAACTTTTTATCGATG AATTCGAGCTCG	C-terminal fusion of *CYC8* with GFP
TUP1-EGFP-forward	TAAAGCAAGGATTTGGAAGTATAAAAAAATAGCGCCAAAT GGTGACGGTGCTGGTTTA	C-terminal fusion of *TUP1* with GFP
TUP1-EGFP-reverse	GTTAGTTACATTTGTAAAGTGTTCCTTTTGTGTTCTGTTC TCGATGAATTCGAGCTCG	C-terminal fusion of *TUP1* with GFP

References

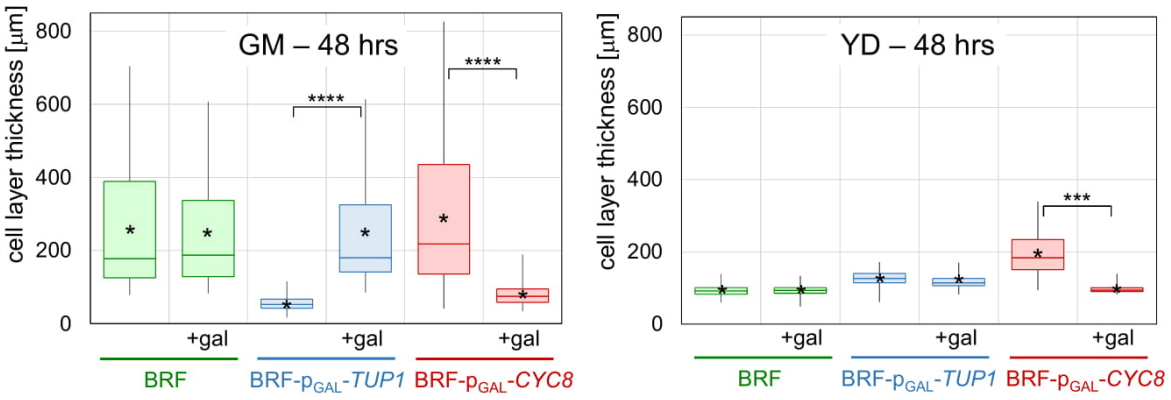
1. Guldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*. **24**, 2519-24.(1996)
2. Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, et al. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast (Chichester, England)*. **21**, 947-62.(2004)
3. Sheff MA, Thorn KS. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*. **21**, 661-70.(2004)



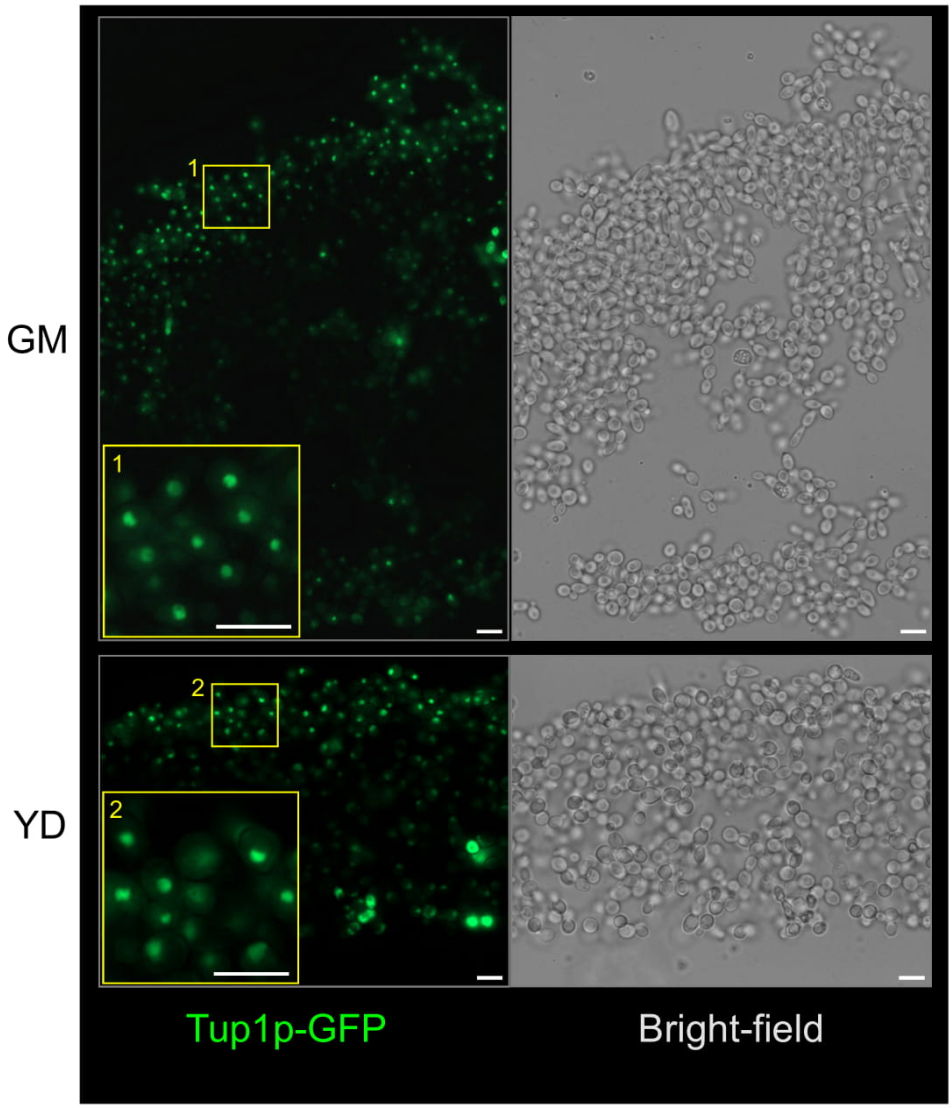
Supplementary Figure 1. **Effect of copper on adhesivity of static BRF, BRF-p_{CUP}-*TUP1* and BRF-p_{CUP}-*CYC8* cells** in GM and YD. Adhesivity of 24-hrs old static cultures in GM (blue bars) or YD (red bars) containing 0-300 μm Cu^{2+} was analyzed by standard assay. Yellow line indicates BA. Four distinct experimental replicates (*n*=4) were measured for each strain and condition with results expressed as the means and s.d.'s. The statistical significance of the variation between two succeeding galactose concentrations was determined using an unpaired two-tailed t test and GraphPad Prism6 software; **** (*p*-value < 0.0001), *** (*p*-value < 0.001), ** (*p*-value < 0.01) and * (*p*-value < 0.05).



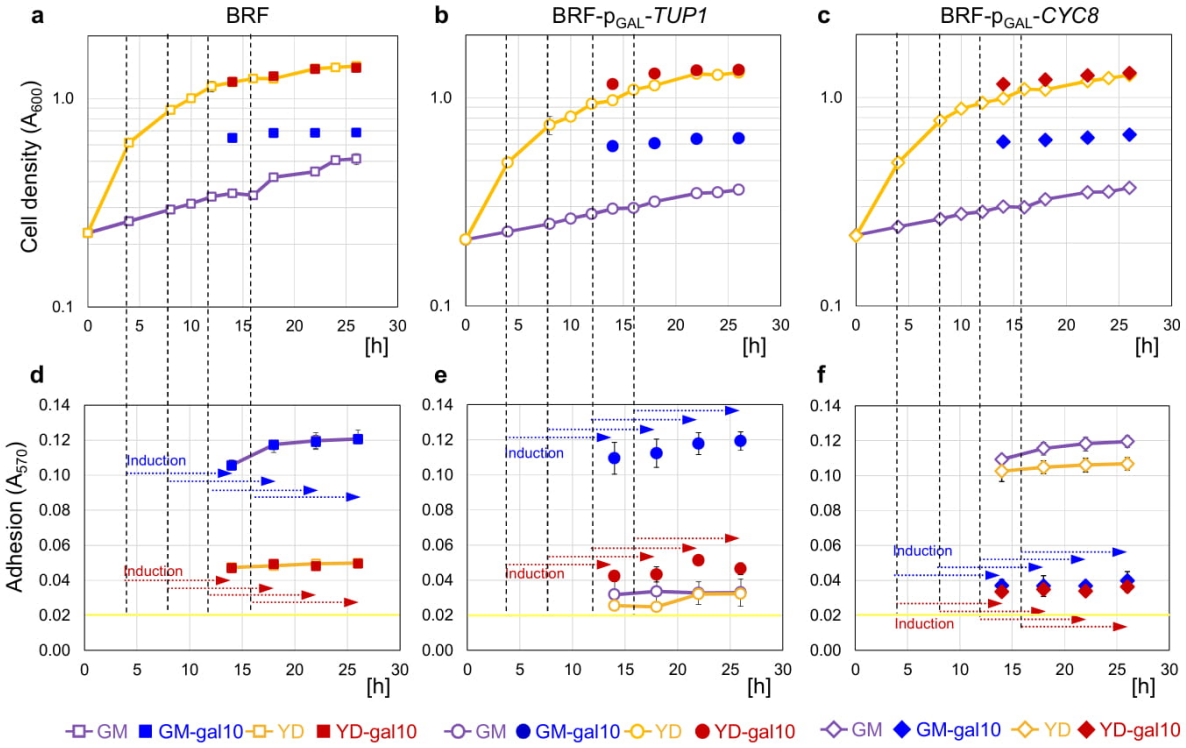
Supplementary Figure 2. Effect of copper and galactose on adhesivity of static BRF, BRF-p_{GAL}-*TUP1*- p_{CUP}-*CYC8* and BRF-p_{GAL}-*CYC8*-p_{CUP}-*TUP1* cells in GM and YD. Adhesivity of 24-hrs old static cultures in GM (blue bars) or YD (red bars) with or without 0.1 % galactose and 300 µM Cu^{2+} as indicated below bar charts was analyzed by standard assay. Yellow line indicates BA. Four distinct experimental replicates (*n*=4) were measured for each strain and condition with results expressed as the means and s.d.'s. The statistical significance of the variation relative to conditions "+gal +Cu^{2+}" was determined using an unpaired two-tailed t test and GraphPad Prism6 software; **** (*p*-value < 0.0001) and *** (*p*-value < 0.001).



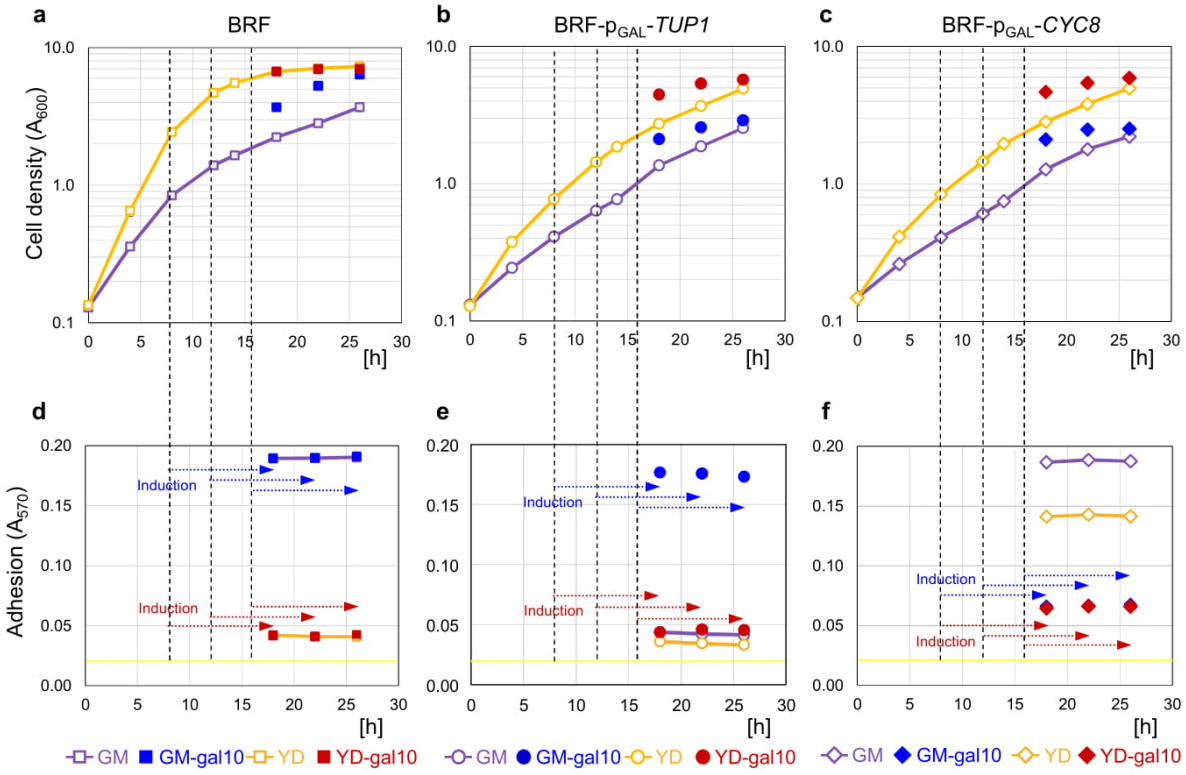
Supplementary Figure 3. Thickness of biofilms and non-adherent cell layers formed by BRF, BRF-p_{GAL}-*TUP1* and BRF-p_{GAL}-*CYC8* cells. Vertical cross-sections of 48-hrs-old static cultures in GM (left) or YD (right) without galactose or treated with 0.1% galactose (gal) were used for measurement of thickness of biofilm/non-adherent cell layers. The box plots show distribution of thickness measured at different positions (low and high wrinkles) within biofilms and non-adherent cells (box extends from the 25th to 75th percentiles with centre line representing the median and whiskers from Min to Max, asterisk indicates the mean). >200 different positions from 3-5 distinct cross-sections were measured for each plot using ImageJ. The statistical significance of the variation between galactose-treated and untreated samples was determined using an unpaired two-tailed t test and GraphPad Prism6 software; **** (p-value < 0.0001) and *** (p-value < 0.001) .



Supplementary Figure 4. Tup1-GFP level in biofilms and non-adherent cell layers. Vertical cross-sections of 24-hrs old static cultures of BRF-Tup1p-GFP strain in GM or YD; Tup1p-GFP fluorescence shown in green, cells are visible in bright-field. Cells in insets "1-2" are shown at higher magnification, indicating intensity of fluorescence of Tup1p-GFP in biofilm/non-adherent cells. Bar, 10 μm. A representative experiment of three (*n*=3) independent experiments is shown.



Supplementary Figure 5. Effect of Tup1p or Cyc8p induction on adhesivity of cells in different growth phases of static cultures. a-c. Strain growth curves in GM and YD. gal10, galactose was added 10 hrs before measurement of the biomass (A_{600}). **d-f**, Adhesivity of the strains without induction and after 10 hrs of galactose induction. Arrows (**d-f**) indicate interval of galactose presence in relation to time-points (indicated by dashed lines) in which galactose was added. Yellow line indicates BA. Experiments were conducted in quadruplicate (distinct samples, *n*=4) with results expressed as the means and s.d.'s.



Supplementary Figure 6. Effect of Tup1p or Cyc8p induction on adhesivity of planktonic cells from different growth phases of shaken cultures. a-c. Strain growth curves in GM and YD. gal10, galactose was added 10 hrs before measurement of the biomass (A_{600}). **d-f**, Adhesivity of the strains without induction and after 10 hrs of galactose induction. Arrows (**d-f**) indicate period of galactose treatment in relation to time-points (indicated by dashed lines) in which galactose was added. Yellow line indicates BA. Experiments were conducted in quadruplicate (distinct samples, *n*=4) with results expressed as the means and s.d.'s.

5.2 Cell Distribution within Yeast Colonies and Colony Biofilms: How Structure Develops

Plocek V., Váchová L., Šťovíček V., Palková Z.

Int J Mol Sci. 2020 May 29;21(11):3873. doi: 10.3390/ijms21113873.

IF_{2019} = 4.556

Kvasinky *S. cerevisiae* vytvářejí na glycerolovém médiu dva typy kolonií. Kmeny izolované z přírody tvoří většinou komplexní strukturované biofilmové kolonie. V laboratorních podmínkách při růstu na dostatku živin však u nich může dojít ke změně fenotypu a začnou tvořit kolonie hladké, které jsou jinak typické pro laboratorní kmeny. Jedním z rozdílů mezi těmito dvěma typy kolonií je tvorba extracelulární matrix u biofilmových kolonií. Během vývoje těchto kolonií dochází také k rozdílné časoprostorové diferenciaci.

V této publikaci jsme se zaměřili na studium distribuce buněk v biofilmových a hladkých obřích koloniích kombinací mikroskopických technik a genetických analýz. Zjistili jsme, že rozdíly struktury mezi oběma typy kolonií vznikají už v časných fázích vývoje kolonií. Pro biofilmové kolonie jsme zavedli model distribuce buněk „panter" a zjistili jsme, že tento typ je závislý na buněčné adhezi zprostředkované FLO11, kde při deleci tohoto adhezinu dochází ke změně na druhý typ distribuce buněk. Pro hladké kolonie jsme zavedli model distribuce buněk „zebra". Oba typy kolonií jsou nezávislé na polaritě buněčného pučení a oddělování buněk. V našich experimentech jsme se také zaměřili na buňky, ze kterých vznikají obří kolonie. Buňky obarvené pomocí fluorescenční barvy AF-TFP jsme sledovali během vývoje kolonie a mapovali jejich osud.

Můj podíl na publikaci: V rámci této práce jsem připravil set delečních (KO) kmenů odvozených od diploidních kmenů BR-F-p_{TEF}-GFP a BR-F a od laboratorních kmenů BY-p_{TEF}-GFP a BY4742 (Tab. 1) a analyzoval vliv jednotlivých delecí na tvorbu kolonií typu „zebra" a biofilmových kolonií typu „panter" prostřednictvím mikroskopie vertikální řezů kolonií (Obr. 4). Dále jsem se zabýval distribucí buněk v průběhu vývoje obou typů kolonií, rovněž prostřednictvím mikroskopie (Obr. 3). Participoval jsem na sepisování publikace.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Cell Distribution within Yeast Colonies and Colony Biofilms: How Structure Develops

Vítězslav Plocek [1,†], Libuše Váchová [2,†], Vratislav Šťovíček [1,‡] and Zdena Palková [1,*]

[1] Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University, BIOCEV, 12800 Prague, Czech Republic; vitezslav.plocek@natur.cuni.cz (V.P.); v.stovicek@seznam.cz (V.Š.)
[2] Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, BIOCEV, 14220 Prague, Czech Republic; vachova@biomed.cas.cz
* Correspondence: zdenap@natur.cuni.cz
† These authors contributed equally to this work.
‡ Present address: Carlsberg Research Laboratory, Carlsberg A/S, J.C. Jacobsens Gade 4, DK-1799 Copenhagen V, Denmark.

Received: 7 April 2020; Accepted: 26 May 2020; Published: 29 May 2020

Abstract: Multicellular structures formed by yeasts and other microbes are valuable models for investigating the processes of cell–cell interaction and pattern formation, as well as cell signaling and differentiation. These processes are essential for the organization and development of diverse microbial communities that are important in everyday life. Two major types of multicellular structures are formed by yeast *Saccharomyces cerevisiae* on semisolid agar. These are colonies formed by laboratory or domesticated strains and structured colony biofilms formed by wild strains. These structures differ in spatiotemporal organization and cellular differentiation. Using state-of-the-art microscopy and mutant analysis, we investigated the distribution of cells within colonies and colony biofilms and the involvement of specific processes therein. We show that prominent differences between colony and biofilm structure are determined during early stages of development and are associated with the different distribution of growing cells. Two distinct cell distribution patterns were identified—the zebra-type and the leopard-type, which are genetically determined. The role of Flo11p in cell adhesion and extracellular matrix production is essential for leopard-type distribution, because *FLO11* deletion triggers the switch to zebra-type cell distribution. However, both types of cell organization are independent of cell budding polarity and cell separation as determined using respective mutants.

Keywords: yeast multicellular structures; colonies and biofilms; structure development; cell organization; laboratory and wild *Saccharomyces cerevisiae* strains; cell adhesion; Flo11p adhesin

1. Introduction

In most natural environments, microbes occur in the form of structured populations such as biofilms and other types of microbial consortia. Whether biofilms of commensal or potentially pathogenic microbes, microbial consortia that decompose waste products, or populations used in the food industry, all of these microbial communities significantly affect the lives of other organisms (including human). Understanding the relationships among microbes in such populations is the first step toward regulating their development and, where necessary, defending against them.

Yeast, similar to other microbes, form various types of multicellular communities that differ in the complexity of their organization. These include diverse types of colonies, biofilms, or mats grown on solid/semisolid surfaces, flor biofilms at the borders between liquid and air environments, and flocs composed of aggregated cells in liquid environments [1–10]. Yeast cells that are differently positioned within these structures differ in their ability to access nutrients and gases (namely oxygen), to remove

waste products (including CO_2), and to interact with neighboring cells. As a consequence, cells at different positions within the structure acquire distinct properties, i.e., start to differentiate to form different cell types. Then, differentiated cells enhance the heterogeneity of the structured environment, which in turn contributes to further stages of cell diversification due to ambient conditions, such as gradients of metabolites and signaling molecules produced by adjacent cells. Those multicellular structures that exhibit high levels of three-dimensional organization (such as colonies and colony biofilms) also exhibit complicated internal organization.

Two major types of structures are formed by yeast *Saccharomyces cerevisiae* grown on semisolid agar. These are smooth colonies formed by most laboratory strains as well as by strains derived by domestication from wild strains and structured colony biofilms formed by some wild strains. Both colonies and colony biofilms are formed by the division of non-motile yeast cells. These cells pass through various stages of differentiation, which are related or unrelated to division and dependent on the growth conditions and properties (e.g., genetic background) of a particular strain. As a result, the three-dimensional (3D) architecture of smooth colonies and colony biofilms differs dramatically [3,8].

Smooth colonies can arise either from single cells (microcolonies) or from cell suspensions of genetically identical cells (giant colonies). Independently of the initial number of inoculated non-differentiated cells, from a specific point of colony growth, further cell development in colonies is coordinated, and cell differentiation is guided by a specific developmental program [11,12]. On complex, respiratory agar medium, *S. cerevisiae* smooth colonies undergo development characterized by phases of acidification and alkalization. After a short initial alkalization (approximately 24 h), giant colonies enter an acidification phase lasting approximately 8–9 days, during which colonies grow linearly. This is followed by the initiation of alkalization that is associated with the production of volatile ammonia, which functions as a signal that is involved in colony synchronization and cell differentiation [8,13,14]. The development of microcolonies is faster and depends on the density of colonies in a territory; the higher the number of colonies, the faster their development [12]. Transition from the acidic phase to the alkali, ammonia signaling period is a key point in colony development, as it is associated with colony differentiation to two major cell types that are specifically positioned within the structure [11,12]. These are U cells localized to upper regions and L cells in internal/lower colony areas. U and L cells significantly differ in morphology, metabolism, and longevity [11], and they gain various features that become apparent only as colonies differentiate upon ammonia signaling. For example, U cells display an unusual combination of metabolic and regulatory features, some of which typically occur in stationary phase yeast cells in liquid cultures, some occur in metabolically active growing cells, and others are specific to colony U cells. Starving L cells are in a resting state and activate various hydrolytic pathways [8,11].

Architecture and properties of *S. cerevisiae* colony biofilms (formed either from single cells or from cell suspension) differ significantly from those of smooth colonies [15,16]. The colony biofilm structure is strongly affected by nutrients, being highly wrinkled on respiratory medium, but less wrinkled or even rather smooth on high glucose media. When glucose is spent, colony biofilms start to acquire structured morphology [17]. Therefore, the most prominent architectural differences between smooth colonies and colony biofilms appear on respiratory media. On such media, colony biofilms are composed of two major parts, one formed mostly of oval shaped cells above the agar (the aerial part) and one inside the agar (biofilm "roots") composed mostly of pseudohyphae invading the agar [16,18]. Cell wall adhesin Flo11p and its regulators Cyc8p and Tup1p are essential for colony biofilm formation [5,18–20]. Different types of cell differentiation have been identified in colony biofilms, some of which contribute to numerous strategies that help to protect the structure against the environment [16]. Surface cell layers are protected via active plasma membrane multidrug resistance transporters Pdr5p and Snq2p, which expel toxic compounds. Cells in the biofilm interior are embedded in the extracellular matrix (ECM), which is believed to have a dual function as a nutrient reservoir and as a low-permeability barrier, blocking the penetration of some compounds (including toxic ones) [16].

Architectural differences and the presence of different cell types in smooth colonies vs. colony biofilms raise an important question: how is the early organization of cells reflected in the resulting differentiated structure? Specifically, whether (and how) the early behavior of laboratory (domesticated) strains and wild strains differ, and whether such differences are reflected in different modes of cell organization and pattern formation. We show here that cells are distributed differently from the beginning of architecture development of smooth colonies and colony biofilms. Furthermore, we show that cell distribution is independent of budding polarity and cell separation, but it is strongly dependent on cell–cell attachment via adhesins and ECM from the early stages of colony formation.

2. Results

2.1. Dynamics of Cell Distribution Differ in Smooth Colonies and Colony Biofilms

To distinguish areas settled by particular cells and thus monitor cell distribution within smooth colonies and colony biofilms from the early phases of their development, we constructed strains (Table 1) derived from BY4742 (laboratory strain) and BR-F (wild strain), expressing gene for green fluorescent protein (GFP) from the constitutive p_{TEF} promoter, which ensures almost the constitutive expression of GFP within colonies [12]. Then, we grew chimeric giant colonies formed from a suspension of smooth colony-forming cells (BY4742 mixed with BY-p_{TEF}-GFP) or biofilm-forming cells (BR-F mixed with BR-F-p_{TEF}-GFP), both mixed in different ratios and plated at different densities on respiratory medium GMA. Using cells of two colors—green (expressing GFP) and black (not expressing GFP; visualized in some experiments using autofluorescence measurement)—allowed us to study the distribution of cells derived from either black or green cell ancestors. Patterns of black and green cells in developing giant colonies and biofilms were analyzed using colony cross-sectioning and two photon confocal microscopy (2PE-CM) (Figure 1).

Chimeric smooth colonies were inoculated using suspension containing equal numbers of green and black cells at concentrations of about 10^8 cells/mL and vertical cross sections of 3-day-old colonies analyzed by 2PE-CM. The regular vertical distribution of green and black cells was observed in central parts of the colony roughly corresponding to the site of inoculation, whereas a diagonal pattern of cells was observed at margin regions (Figure 1a). This "zebra"- type patterning was independent of the ratio of inoculated strains and density of plating; cell density influenced only the thickness and number of black and green cell columns, appearing as zebra stripes in cross-sections. In colonies inoculated with a lower cell number (lower cell density of the inoculum), the black and green columns were thicker than in colonies inoculated with a higher cell number (higher cell density) (Figure 1a). The relative number and thickness of green and black columns also depended on the ratio of green to black cells in the inoculation suspension. The vertical pattern of green and black cells was still clearly visible in later phases of colony development in upper cell layers differentiated to U cells. Hence, the process of U and L cell differentiation is independent of primary distribution of cells within smooth colonies.

Chimeric colony biofilms were grown on GMA from a spot inoculated with a mixture of equal numbers of BR-F and BR-F-p_{TEF}-GFP cells. Vertical cross-sections of 3-day-old biofilms were analyzed by 2PE-CM; black cells were detected by autofluorescence for easier orientation in the structure (Figure 1b; false red color). In contrast to the zebra phenotype of smooth chimeric colonies, the pattern of green and black cells in chimeric colony biofilms was irregular. The chimeric biofilms were composed of larger and smaller red and green cell areas spread within the biofilm rather randomly (Figure 1b). The black areas present within green/red areas are cell-free cavities containing ECM. This "leopard-type pattern was independent of plating density.

Table 1. Strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
BR-F	MATa/MATα, wild strain isolate	[15]
BR-F-p_{TEF}-GFP	MATa/MATα, *his3*::NatMX-p_{TEF}-GFP/*HIS3*	this study
BR-F-*rsr1*	MATa/MATα, *rsr1*Δ::KanMX/*rsr1*Δ:: HphMX	this study
BR-F-*rsr1*-p_{TEF}-GFP	MATa/MATα, *rsr1*Δ::KanMX/*rsr1*Δ:: HphMX, *his3*::NatMX-p_{TEF}-GFP/*HIS3*	this study
BR-F-*flo11*	MATa/MATα, *flo11*Δ::KanMX/*flo11*Δ::Ble	[16]
BR-F- *flo11*-p_{TEF}-GFP	MATa/MATα *flo11*Δ::KanMX/*flo11*Δ:: Ble, *his3*::HphMX-p_{TEF}-GFP/*HIS3*	J. Maršíková
BY4742	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0	Euroscarf
BY-p_{TEF}-GFP	MATα, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *his3*::NatMX-p_{TEF}-GFP	[12]
BY-*ace2*	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *ace2*::KanMX	this study
BY-*ace2* -p_{TEF}-GFP	MATα, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *ace2*::KanMX, *his3*::NatMX-p_{TEF}-GFP	this study
BY-*rsr1*	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rsr1*::KanMX	this study
BY-*rsr1*-p_{TEF}-GFP	MATα, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rsr1*::KanMX, *his3*::NatMX-p_{TEF}-GFP	this study
BY-*bud2*	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *bud2*::KanMX	this study
BY-*bud2* -p_{TEF}-GFP	MATα, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *bud2*::KanMX, *his3*::NatMX-p_{TEF}-GFP	this study

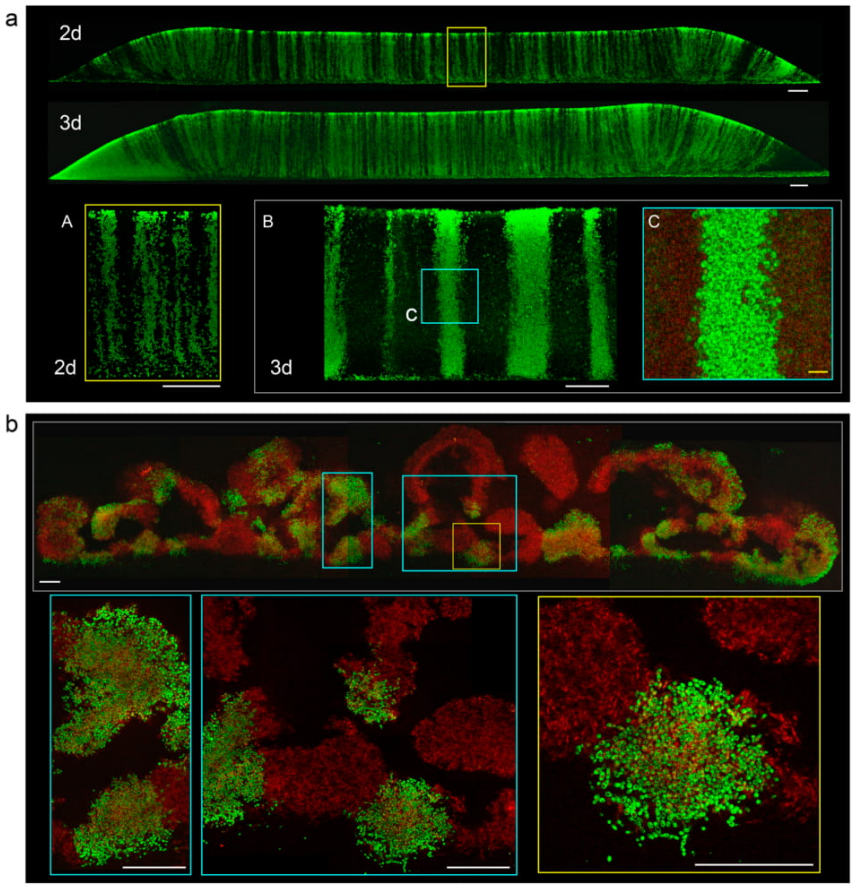


Figure 1. Vertical cross-sections of chimeric smooth colonies and colony biofilms. (**a**) Cross-sections visualized by two photon confocal microscopy (2PE-CM) of 2-day-old and 3-day-old chimeric giant colonies of strains BY4742 (black stripes) and BY-p_{TEF}-GFP (green stripes), mixed equally, and inoculated as 1 μL drops of 10^8 cells/mL. Lower panel, details of stripes in higher magnification, of 2-day-old colony as above (A) and from 2-day-old colony inoculated by 1 μL drops of 10^6 cells/mL (B and inset C). White bar, 100 μm, yellow bar, 10 μm. (**b**) Cross-sections of chimeric giant colony biofilm formed by biofilm-forming cells (BR-F) and BR-F-p_{TEF}-GFP mixed equally and inoculated as 1 μL drops of 10^8 cells/mL. Here, the autofluorescence of "black" BR-F cells is visualized as a false red color. The cell-free areas filled with extracellular matrix (ECM) are black. Insets show parts of the colony biofilm in higher magnification. Bar, 100 μm.

2.2. "Zebra" Versus "Leopard" Cell Distribution Arises in Early Stages of Colony/Biofilm Development

Next, we analyzed cell growth during the initial interval of 0–24 h after the inoculation of both types of chimeric structures. Black and green cells were inoculated with equal number of cells at standard density (Figure 2, time 0 h). During the initial approximately 12 h, BY-derived cells grew horizontally on the agar surface, mostly as a monolayer, forming mosaic structures of black and green cells (Figure 2, time 12 h), which remained clearly visible in later stages when viewed from above (Figure 2, time 21 and 24 h). Thereafter, cells started to grow vertically and form 3D structure. Since the growth rates of green and black cells were similar, each cell type could expand only into the vertical space above the agar area, which was occupied by that particular cell type during the initial horizontal growth. As a result, relatively regular green and black columns were formed (Figure 1a). In contrast, BR-F-derived cells, from the outset, started to create small 3D structures, already visible after 4 h of growth (Figure 2, 4 h, examples indicated by arrows). Thus, individual 3D microcolonies are formed much earlier, before the chimeric cell population has covered the surface of the inoculated agar area (between 21 and 24 h), and they become larger as the chimeric colony grows and apparently form the basis of the leopard-type structure of the biofilm.

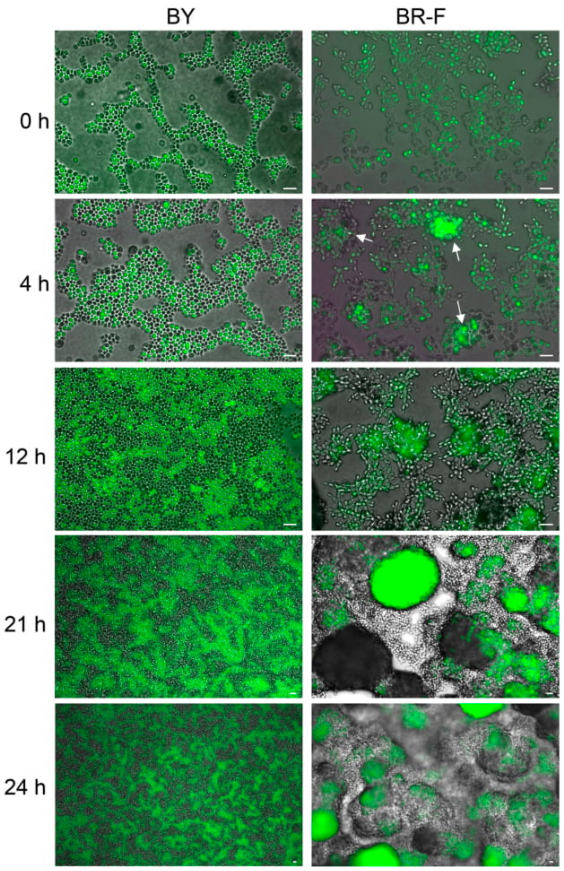


Figure 2. Timeline of cell growth in inoculated area. Agar surface was inoculated with a mixture of BY4742 (black cells) and BY-p_{TEF}-GFP (green cell), and with a mixture of BR-F (black cells) and BR-F-p_{TEF}-GFP (green cell), the strains were mixed equally as in Figure 1; 1 µL drops of 10^8 cells/mL were used for inoculation. The presence of black and green cells was detected by combining GFP fluorescence imaging and bright field microscopy. Arrows indicate examples of BR-F/BR-F-p_{TEF}-GFP cell clusters already forming 3D structures after 4 h of growth.

Next, we analyzed the 3D distribution of originally inoculated cells and offspring cells in both types of structure. We vitally stained the proteins on the surface of BY4742 and BR-F cells with AlexaFluor488 5-TFP (AlexaFluor488 carboxylic acid, 2,3,5,6-tetrafluorophenyl ester amine-reactive probe) and used them for colony/biofilm inoculation. During yeast cell division, the cell wall material of the mother cells is not redistributed to the daughters, and thus stained proteins remain attached to the originally labeled cells [21,22]. A relatively high number of stained cells was used for the inoculation of giant colonies/biofilms to be able to monitor the localization of original stained cells, using colony cross-sections and fluorescence microscopy. Stained cells remained localized to the lower parts of smooth colonies (Figure 3), which, together with the zebra pattern observed in chimeric colonies, indicated that offspring were mostly distributed upwards in a vertical direction. Only occasionally, a few stained cells were re-located to higher colony areas. From day 3–4, an additional thin layer of unstained cells appeared at the colony bottom, indicating that a few cell divisions also occurred in this region. In BR-F biofilms, the majority of stained cells also remained in lower regions. However, a significant number of stained cells (and even clusters of these cells) was relocated upwards, relatively far from the site of their inoculation, and they became localized mostly within the wrinkles even in older colonies, some of the clusters reaching almost to the surface of the aerial part (Figure 3).

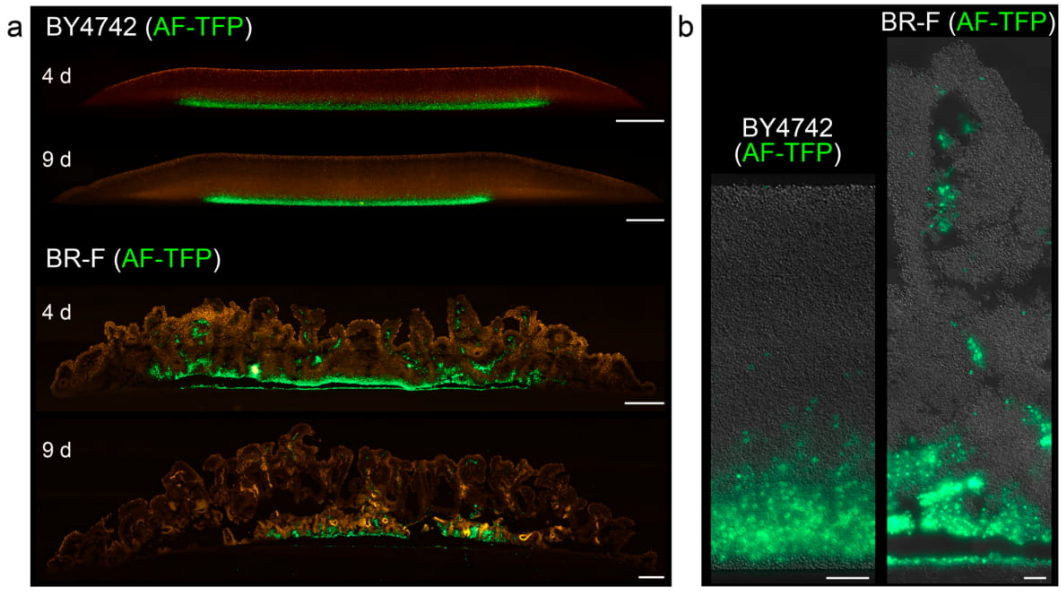


Figure 3. Distribution of cells stained with AlexaFluor488 5-TFP in giant colonies and colony biofilms. Cross-sections of whole 4 and 9-day-old smooth colonies (BY4742) and colony biofilms (BR-F) (**a**) and parts of the structures in higher magnification (**b**). In green, cells stained with AlexaFluor488 5-TFP (AF-TFP) used for inoculation. Offspring cells are indicated in false red: autofluorescence (a) and in differential interference contrast (DIC) (b) Bar, 500 µm (a), 50 µm (b).

2.3. Zebra vs. Leopard Cell Distribution Depends on Cell Adhesiveness, but Not on the Type of Cell Division or Cell Separation

BY4742 and BR-F structures differ in various key characteristics including cell adhesiveness related to the formation of cell clusters, the production of the extracellular matrix, and a dimorphic switch, related to an ability to form pseudohyphae [8]. Some of these features are dependent on *FLO11*, which is the gene for Flo11p surface adhesin, the production of which is reduced in smooth colonies [18]. Haploid and diploid yeast strains differ also in budding polarity [23,24], which is axial/random in haploid BY4742 and unipolar/bipolar/random in BR-F [18]. Therefore, we analyzed, which of these parameters, if any, could be the key factor in zebra vs. leopard cell distribution and thus in the organization of the colonies/biofilms. We constructed a series of strains derived from

BY4742/BY4742-p_{TEF}-GFP and/or BR-F/BR-F-p_{TEF}-GFP, which are deleted in genes involved in the above-mentioned characteristics (Table 1). Specifically, we constructed knockout (KO) randomly budding strains *bud2* and *rsr1* deleted in genes involved in bud-site selection [23], strain *ace2* with cell separation defects [25], and strain *flo11*. Respective pairs of KO strains (labeled and non-labeled with GFP) were used for the inoculation of chimeric colonies/biofilms.

The deletion of either *BUD2* or *RSR1* genes leading to the random budding of BY4242 did not affect zebra-type cell distribution (Figure 4a). As expected, the deletion of *ACE2* caused defects in cell separation, and thus clusters of non-separated cells were formed in BY-*ace2* culture (Figure 4a), partially resembling cell clusters observed in colony biofilms [16,26]. However, the formation of these cell clusters did not cause a prominent change in colony structure and zebra-like cell distribution. The only difference was that the stripes were thicker and the edges of the stripes were more frayed than in BY4742 colonies (plated in the same density) due to the presence of the clusters (Figure 4a, right panel). Hence, defects in neither cell budding polarity nor cell-cluster formation cause a change from zebra to leopard cell distribution.

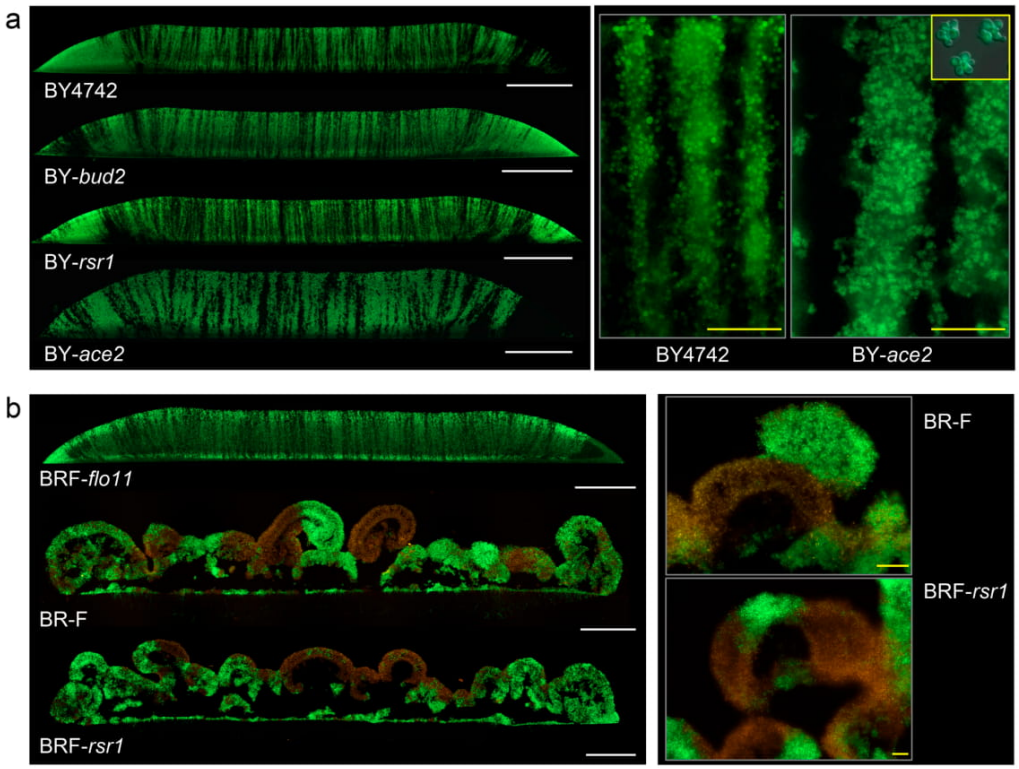


Figure 4. The effect of impaired budding polarity, cell separation, and cell adhesion on the formation of chimeric giant colonies and colony biofilms. (**a**) Cross-sections of chimeric colonies formed by knockout (KO) strains as indicated, derived from BY4742; the BY4742 colony is shown as a control. Details of BY-*ace2* stripes as compared to BY4742 stripes are shown in the right panel. Inset (yellow rectangle), individual clusters of non-separated BY-*ace2* cells grown in GM liquid medium. White bar, 500 μm; yellow bar, 50 μm. (**b**) Whole cross-sections of chimeric colony biofilm formed by KO strains in gene *RSR1* or *FLO11* derived from BR-F; BR-F colony biofilm as a control (white bar, 500 μm), and examples of aerial parts in higher magnification (right; yellow bar, 100 μm). 1 μL drops of 10^8 cells/mL were used for inoculation.

Deletion of the *RSR1* gene in strain BR-F did not affect the formation of colony biofilm and leopard-type cell distribution (Figure 4b). However, deletion of the *FLO11* gene, which disrupts both cell adhesion and ECM production and leads to smooth colony formation [18,20,26], completely

changed cell distribution from leopard to zebra type (Figure 4b). Hence, it is the ability of cells to adhere, and maybe to produce ECM, not budding polarity, that determines leopard-type cell distribution.

3. Discussion

According to their properties, yeast strains form either colony biofilms under specific nutritive conditions such as respiratory media or smooth colonies under any circumstances. Wild strains can switch off their ability to form biofilms (and all biofilm-specific features) after sustained growth on plentiful nutrients such as high glucose [15,27]. This process, called domestication, is reversible, as strains are able to switch back to biofilm mode under severe stress and starvation conditions [27]. In contrast, laboratory strains, which were domesticated centuries ago and adapted to high nutrients over a long period, always form smooth colonies independently of conditions of their growth. The smooth-colony and structured-biofilm lifestyles differ in many parameters, including the organization of architecture of and cell differentiation in these structures [8]. We show here that the internal organization of the smooth-colony vs. structured-biofilm population is determined in the early phases of structure development and results in two fundamentally different modes of cell distribution: "zebra-type" and "leopard-type" (Figure 5), each exhibiting specific characteristics.

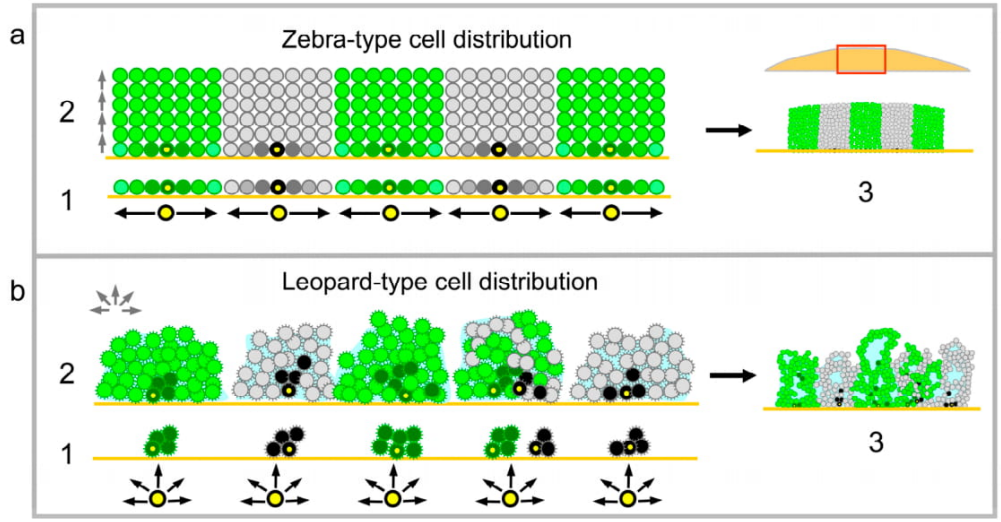


Figure 5. Model of cell distribution during the formation of colonies (**a**) and colony biofilms (**b**). Schematic view on cross-sections of young chimeric giant colony (about 12 h old) or colony biofilm (about 4-h-old) (1); 24-h-old (2); and 3-day-old (3) structures. Black and gray cells show old and younger black cells, respectively, dark and light green show old and younger green cells, respectively. For 1 in a, the lighter the color of the cell, the younger the cell. Original inoculated cells are marked in yellow. Red rectangle in a/3 shows the localization of green/black schematic within the whole colony cross-section. Black and green arrows indicate the direction of cell growth in 1 and in 2; light blue, ECM; cell surface brushes in (**b**), adhesive fibers.

In zebra-type chimeric giant colonies, growing cells first occupy the inoculation area, forming a cell monolayer. Thereafter, when no "horizontal" space on the agar is available, cells are forced to grow upwards in a vertical direction. As the growth rate of green and black strains is the same, the green/black offspring cells can only fill the space above the agar area that each type initially occupied, thus creating relatively regular columns of cells seen as stripes in vertical colony cross-sections (Figure 5a). Hence, in this type of structure, cells that are chronologically older are present in lower areas of colonies (near to the bottom), whereas only a few older cells are occasionally pushed upwards to reach higher layers of the colony. The younger offspring cells are distributed upwards to areas, which are further from the nutrients in the agar. The thickness of the columns of cells originating from one cell ancestor plated

during giant colony inoculation depends on the density of cell plating, which defines a space around each ancestor cell that can subsequently be occupied by its progeny during the monolayer growth phase (Figure 5a). Differentiation to U and L cells, accomplished later as the colonies become aged and undergo ammonia signaling [11], was identical in green and black columns of chimeric giant colonies composed of cells that are genetically identical with the exception of GFP. Thus, the formation of U and L cells is dependent on the particular cell position within the colony and the stage of colony development, but not on cell history. For example, U cells were always formed in upper cell layers, in which the cells are the progeny of different vertically grown ancestor cells (Figure 1a).

In leopard-type giant colony biofilms, cell distribution is less regular than in zebra structures. From the first hours of development, cells remain attached to each other and to the semisolid agar and form small three-dimensional microcolonies (Figure 5b). These microcolonies are either composed of the progeny of a single-type ancestor (containing only black or green cells in chimeric biofilms) or several ancestors that have been inoculated in close proximity and are thus attached to each other (microcolonies composed of both green and black cells). The microcolonies continue to grow in all 3 dimensions and only later join to form one giant colony biofilm, which includes various aerial wrinkles. Individual wrinkles can either all be black or green, or they can be a mosaic structure (black and green), which is probably dependently on whether they arise from microcolonies of single-type ancestors or those of both types of ancestors. The production of ECM, which apparently participates in the formation of wrinkles, could contribute to the relatively irregular positioning of black and green cell clusters within the leopard structures. As shown in colony biofilms grown from AlexaFluor488 5-TFP stained cells, a significant number of the stained cells is distributed upwards to different colony wrinkles (far from the inoculated layer of stained cells, which remain at the bottom of the biofilm). Hence, in contrast to zebra-type structures, chronologically older and younger cells can be more mixed in leopard-type biofilms, due to cell–cell adhesion and mechanical forces of the ECM. On other hand, in leopard-type biofilms, as in zebra structures, cell differentiation leading to specific spatially positioned cell types such as cells with active multidrug resistance transporters or cells producing ECM [16] does not correlate with the pattern of cell distribution in the biofilm, but it does correlate with the cell position in the structure.

Both zebra-type and leopard-type cell distributions are independent of the genetically controlled polarity of cell division as shown using knockout strains (*bud2*, *rsr1*) with disrupted bud site selection. This finding is in agreement with previously published data showing that changes in cell polarity and budding influence morphology of yeast colonies only moderately or not at all [28]. In contrast to BY4742 colonies, in which cells do not mutually adhere despite being close to one another, BR-F cells are usually present in clusters, even after they are separated from colony biofilms or grown in liquid cultures. Flo11p adhesin is essential for many processes related to biofilm development (including cell adhesion, the formation of thin fibers connecting cells within biofilms, and ECM production) [16,18–20,26]; it is present in cell–cell adhesion sites of cell clusters formed by strain Σ1267 and in higher concentrations than in other areas of the cell wall [26]. Strain Σ1267 forms colony biofilms similar to those of BR-F [16,26]. A defect in cell separation during division due to the deletion of the *ACE2* gene causes cell clustering of BY4742 cells, which at first glance is similar to the clustering of BR-F cells. However, the mechanisms of formation of these two types of clusters are different. BY-*ace2* clusters are formed via incomplete cell separation during division where daughter cells remain associated with their mothers [25], whereas BR-F clusters are formed via the adhesion of cell walls of already separated cells, thus potentially of daughters of different mothers. Cluster formation by incomplete cell separation in BY-*ace2* did not change zebra-type colonies to leopard-type biofilms, whereas deletion of the *FLO11* adhesin gene in BR-F switched leopard-type cell distribution to zebra-type cell distribution completely. Hence, a simple ability to form cell clusters is not sufficient to switch from zebra-to-leopard cell distribution, but the ability of cells to mutually adhere (independently of how they are related) due to their cell wall properties is a key parameter for this switch. Possibly, in contrast to BY-*ace2* clusters that are rather rigid, cell-wall/fiber-mediated adhesion is more flexible and

allows the reorganization of cell groups during biofilm development, as indicated also by the mosaic pattern of black and green cell clusters in chimeric colonies. Thus, the relationship among some of the adhered cells in colony biofilms could resemble that of cells in flocs, pellicles, and flor biofilms [7,10], which are formed by the adhesion of cells that are not directly related.

In summary, new findings indicate that properties related to cell wall, adhesins, and ECM are key parameters that can distinguish the ability of cells to organize differently and subsequently to form different types of multicellular structures on semisolid media. This contrasts with findings that identified defects in cell division (for example due to *ACE2* deletion) and the formation of so-called snowflake yeast as potential mechanisms involved in the origins of multicellularity in liquid cultures [29].

4. Materials and Methods

4.1. Yeast Strains and Cultivation

All *S. cerevisiae* strains prepared in this study (Table 1) were derived from the wild strain BR-F from a collection at the Institute of Chemistry (Slovak Academy of Sciences) or from the laboratory strain BY4742 from the Euroscarf collection. Giant colonies were inoculated with 1 μL of cell suspension (concentration 10 mg wet weight biomass/mL corresponding to 10^8 cells/mL, approximately, unless otherwise indicated) and grown on respiratory GMA medium (3% glycerol, 1% yeast extract, and 2% agar) at 28 °C. Biofilm structures are formed on respiratory medium, whereas biofilm formation is inhibited on glucose medium [9,17]. GM liquid medium (GMA without agar) was used in some experiments.

Chimeric colonies were inoculated with a mixed suspension composed of an equal number of cells of two strains unless otherwise stated. Representative experiments of at least three independent replicates are shown.

4.2. Strain Constructions

Strains expressing GFP under the control of constitutive promoter p_{TEF} were constructed using integration cassettes amplified from plasmids pYM-N21 (nat selection; from Euroscarf collection) and pHLA21 (derived from pYM-N21 by including hph selection gene; provided by O. Hlaváček) integrated into the *HIS3* locus of BY4742 and BR-F strains according to [30]. Gene knockouts were performed by transforming the cells with deletion cassettes generated by PCR from plasmid pUG6 (kanMX selection, from Euroscarf collection) and pUG6-32 (derived from pUG6, hph selection; [31]) using primers with homology to overhangs flanking the open reading frame of the particular gene according to [32]. Yeast cells were transformed as described in [33].

4.3. Staining of Cells by AlexaFluor488 5-TFP

Cells were vitally stained with AlexaFluor488 carboxylic acid, 2,3,5,6-tetrafluorophenyl ester amine-reactive probe (molecular probes). Labeling was performed according to the manufacturer's manual. In brief, cells in 0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 8.6 were stained with the probe dissolved in DMSO (final concentration 0.1 mg/mL). After 20 min at room temperature, cells were washed 3 times with sterile water to remove the unbound probe. Then, 1 μL drops of stained cells in water were used for giant colony inoculation (cell concentration ~5×10^9 cells/mL).

4.4. Microscopy of Cells in Multicellular Structures

Analysis of cell growth on agar: Cells and microcolonies growing in the inoculated area were imaged by a Leica DMR microscope with a GFP filter and in the bright field, using NIS Elements software (Laboratory Imaging, Inc.).

Analysis of vertical colony cross-sections: the internal structure of chimeric giant colonies and biofilms was visualized by two photon excitation confocal microscopy as described [16,34]. In brief,

colonies or biofilms were embedded in agarose and cut vertically with the cut surface placed on a coverslip. Side views of colonies were obtained by 2PE-CM using a confocal scanning microscope (SP8 AOBS VLL MP; Leica) fitted with a mode-locked laser (Ti:Sapphire Chameleon Ultra; Coherent Inc.) and 20×/0.70 or 63×/1.20 water immersion plan Apochromat objectives. Excitation wavelengths of 920 nm was used with the emission bandwidths of 480–595 nm and 600–740 nm for GFP and cell autofluorescence detection. Images of the whole colonies and the insets (Figure 1) were obtained by combining two or more images from neighboring fields of view. Alternatively, thin sections were prepared from giant colonies and biofilms and analyzed by fluorescence microscope as described [11]. In brief, colonies were embedded in 3% and biofilms in 4% agarose and sectioned using a Leica VT1200S vibrating microtome. Sections were observed using Carl Zeiss Axio Observer.Z1 fluorescence microscope equipped with an Axiocam 506 and an Apochromat 10×/0.45W objective or an Apochromat 63×/1.20W (for GFP expression or AlexaFluor488 5-TFP staining) using ZEN 2012 (blue edition) software. Filter sets for GFP (excitation 450–490 nm; emission 500–550 nm), for autofluorescence detection (excitation 538–562 nm; emission 570–640 nm), DIC, or bright field were used.

Author Contributions: Conceptualization, Z.P. and L.V.; methodology, V.P., L.V. and Z.P.; validation, V.P., L.V., V.Š. and Z.P.; formal analysis, Z.P.; investigation, V.P., L.V., V.Š. and Z.P.; resources, L.V. and Z.P.; writing—original draft preparation, Z.P. and L.V.; writing—review and editing, V.P., L.V., V.Š. and Z.P.; visualization, L.V. and Z.P.; supervision, Z.P. and L.V.; funding acquisition, L.V. and Z.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by Czech Science Foundation 19-11384S, by LQ1604 NPU II provided by MEYS and by RVO 61388971; research was performed in BIOCEV supported by CZ.1.05/1.1.00/02.0109 provided by ERDF and MEYS.

Acknowledgments: The authors thank Derek Wilkinson for proofreading of the manuscript, Ota Hlaváček for plasmid pHLA21 and Jana Maršíková for strain BRF-*flo11*-p_{TEF}-GFP.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

3D	Three-dimensional
2PE-CM	two photon confocal microscopy
ECM	extracellular matrix
AlexaFluor488	AlexaFluor488 carboxylic acid, 2,3,5,6-tetrafluorophenyl ester
5-TFP	amine-reactive probe
DIC	differential interference contrast

References

1. Blankenship, J.R.; Mitchell, A.P. How to build a biofilm: A fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 588–594. [CrossRef] [PubMed]
2. Lohse, M.B.; Gulati, M.; Johnson, A.D.; Nobile, C.J. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 19–31. [CrossRef]
3. Palkova, Z.; Vachova, L. Yeast cell differentiation: Lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2016**, *57*, 110–119. [PubMed]
4. Pujol, C.; Daniels, K.J.; Soll, D.R. A Comparison of switching and biofilm formation between *MTL13* homozygous strains of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Eukaryot. Cell* **2015**, *14*, 1186–1202. [CrossRef] [PubMed]
5. Reynolds, T.B. Going with the Flo: The role of Flo11-dependent and independent interactions in yeast Mat formation. *J. Fungi.* **2018**, *4*, E132.
6. Reynolds, T.B.; Fink, G.R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **2001**, *291*, 878–881. [CrossRef]
7. Smukalla, S.; Caldara, M.; Pochet, N.; Beauvais, A.; Guadagnini, S.; Yan, C.; Vinces, M.D.; Jansen, A.; Prevost, M.C.; Latge, J.P.; et al. *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* **2008**, *135*, 726–737. [CrossRef]

8. Vachova, L.; Palkova, Z. How structured yeast multicellular communities live, age and die? *FEMS Yeast Res.* **2018**, *18*, foy033.
9. Van Nguyen, P.; Plocek, V.; Vachova, L.; Palkova, Z. Glucose, Cyc8p and Tup1p regulate biofilm formation and dispersal in wild *Saccharomyces cerevisiae*. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2020**, *6*, 7. [CrossRef]
10. Zara, S.; Bakalinsky, A.T.; Zara, G.; Pirino, G.; Demontis, M.A.; Budroni, M. *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 2934–2939.
11. Cap, M.; Stepanek, L.; Harant, K.; Vachova, L.; Palkova, Z. Cell differentiation within a yeast colony: Metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Mol. Cell* **2012**, *46*, 436–448. [CrossRef] [PubMed]
12. Vachova, L.; Hatakova, L.; Cap, M.; Pokorna, M.; Palkova, Z. Rapidly developing yeast microcolonies differentiate in a similar way to aging giant colonies. *Oxid Med. Cell Longev.* **2013**, *2013*, 102485. [CrossRef] [PubMed]
13. Palkova, Z.; Forstova, J. Yeast colonies synchronise their growth and development. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1923–1928.
14. Palkova, Z.; Janderova, B.; Gabriel, J.; Zikanova, B.; Pospisek, M.; Forstova, J. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* **1997**, *390*, 532–536. [CrossRef] [PubMed]
15. Kuthan, M.; Devaux, F.; Janderova, B.; Slaninova, I.; Jacq, C.; Palkova, Z. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 745–754. [PubMed]
16. Vachova, L.; Stovicek, V.; Hlavacek, O.; Chernyavskiy, O.; Stepanek, L.; Kubinova, L.; Palkova, Z. Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *J. Cell Biol.* **2011**, *194*, 679–687.
17. Granek, J.A.; Magwene, P.M. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genet.* **2010**, *6*, e1000823. [CrossRef]
18. Stovicek, V.; Vachova, L.; Kuthan, M.; Palkova, Z. General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal. Genet. Biol.* **2010**, *47*, 1012–1022. [CrossRef]
19. Nguyen, P.; Hlavacek, O.; Marsikova, J.; Vachova, L.; Palkova, Z. Cyc8p and Tup1p transcription regulators antagonistically regulate Flo11p expression and complexity of yeast colony biofilms. *PLoS Genet.* **2018**, *14*, e1007495. [CrossRef]
20. Voordeckers, K.; De Maeyer, D.; van der Zande, E.; Vinces, M.D.; Meert, W.; Cloots, L.; Ryan, O.; Marchal, K.; Verstrepen, K.J. Identification of a complex genetic network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology. *Mol. Microbiol.* **2012**, *86*, 225–239. [CrossRef]
21. Cabib, E.; Roberts, R.; Bowers, B. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 763–793. [CrossRef] [PubMed]
22. Vachova, L.; Palkova, Z. Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 711–717. [CrossRef]
23. Chant, J.; Herskowitz, I. Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell* **1991**, *65*, 1203–1212. [PubMed]
24. Chant, J.; Pringle, J.R. Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 751–765. [CrossRef]
25. Bidlingmaier, S.; Weiss, E.L.; Seidel, C.; Drubin, D.G.; Snyder, M. The Cbk1p pathway is important for polarized cell growth and cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **2001**, *21*, 2449–2462. [CrossRef] [PubMed]
26. Vopalenska, I.; Stovicek, V.; Janderova, B.; Vachova, L.; Palkova, Z. Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environ. Microbiol.* **2010**, *12*, 264–277. [CrossRef] [PubMed]
27. Stovicek, V.; Vachova, L.; Begany, M.; Wilkinson, D.; Palkova, Z. Global changes in gene expression associated with phenotypic switching of wild yeast. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 136. [CrossRef]
28. Vopalenska, I.; Hulkova, M.; Janderova, B.; Palkova, Z. The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. *Res. Microbiol.* **2005**, *156*, 921–931.
29. Ratcliff, W.C.; Fankhauser, J.D.; Rogers, D.W.; Greig, D.; Travisano, M. Origins of multicellular evolvability in snowflake yeast. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6102. [CrossRef]

30. Janke, C.; Magiera, M.M.; Rathfelder, N.; Taxis, C.; Reber, S.; Maekawa, H.; Moreno-Borchart, A.; Doenges, G.; Schwob, E.; Schiebel, E.; et al. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **2004**, *21*, 947–962.
31. Podholová, K.; Plocek, V.; Rešetárová, S.; Kučerová, H.; Hlaváček, O.; Váchová, L.; Palková, Z. Divergent branches of mitochondrial signaling regulate specific genes and the viability of specialized cell types of differentiated yeast colonies. *Oncotarget* **2016**, *7*, 15299–15314. [PubMed]
32. Guldener, U.; Heck, S.; Fielder, T.; Beinhauer, J.; Hegemann, J.H. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2519–2524. [CrossRef] [PubMed]
33. Gietz, R.D.; Woods, R.A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Method Enzymol.* **2002**, *350*, 87–96.
34. Vachova, L.; Chernyavskiy, O.; Strachotova, D.; Bianchini, P.; Burdikova, Z.; Fercikova, I.; Kubinova, L.; Palkova, Z. Architecture of developing multicellular yeast colony: Spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 1866–1877. [PubMed]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

5.3 Divergent branches of mitochondrial signaling to regulate specific genes and viability of specialized cell types of differentiated yeast colonies

Podholová K., Plocek V., Rešetárová S., Kučerová H., Hlaváček O., Váchová L., Palková Z.

Oncotarget. 2016 Mar 29;7(13):15299-314. doi: 10.18632/oncotarget.8084.

IF_{2016} = 5,168

V této práci jsme se zabývali studiem mitochondriální retrográdní dráhy (RTG) ve vyvíjející se kolonii *S. cerevisiae*. Z předchozích výsledků bylo známo, že při růstu na glycerolovém médiu dochází v kvasinkové kolonii kmene BY4742 při přechodu do alkalické fáze růstu k diferenciaci na dvě buněčné subpopulace, U a L. Jedním z důležitých znaků, kterými se tyto dvě subpopulace liší, jsou mitochondrie, kdy v U buňkách jsou velké mitochondrie s redukovanými kristami a sníženou respirační schopností, zatímco v L buňkách jsou menší, dobře vyvinuté mitochondrie s vyšší respirační schopností.

V naší práci jsme ukázali, že RTG je aktivní ve všech buňkách jak v acidické fázi růstu, tak v diferencované alkalické kolonii. Dále jsme zjistili, že RTG dráha je komplexní a v rámci kolonie rostoucí na glycerolovém médiu můžeme rozlišit tři různé divergentní větve RTG regulace, které jsou specifické pro různé oblasti kolonie. Nově identifikované geny, regulované RTG dráhou, jsou *ATO1* (*ADY2*) a *ATO2* v Ato-větvi regulace RTG dráhy, které jsou specificky exprimované v U buňkách za podmínek aktivního komplexu TORC1, jenž podle literatury inhibuje RTG dráhu. Druhou větví je Cit2-větev s typickým Cit2p proteinem indukovaným RTG dráhou, který je exprimován v horních L buňkách za neaktivního komplexu TORC1. Třetí větev RTG signalizace je zodpovědná za přežívání buněk v L vrstvě alkalické kolonie, přerušení RTG dráhy má u těchto buněk za následek výrazně snížené přežívání. Také jsme ukázali, že negativní regulátor RTG dráhy Mks1 specificky reguluje jednotlivé větve RTG regulace v kolonii.

Můj podíl na publikaci: V práci jsem se podílel především na části týkající se Ato-větve RTG regulace. Během analýzy různých transkripčních faktorů na expresi Ato1p, Ato2p a Ato3p proteinů (v rámci GAUK 686512) jsem zjistil, že proteiny Ato1p a Ato2p jsou regulovány pomocí RTG dráhy. V rámci této práce jsem připravil všechny kmeny se značenými Ato-GFP a jejich kombinace s deletovanými geny regulátorů RTG dráhy (*RTG1*, *RTG2*, *RTG3*, *MKS1*, *BMH1*, *BMH2*) a také vícenásobné delece genů RTG dráhy (*RTG* a *MKS1*). Celkem se jednalo o 33 konstruktů (Tab. 1). Dále jsem analyzoval vývoj obřích kolonií těchto kmenů a dokumentoval přítomnost vrstvy špatně životaschopných dolních L buněk ve stárnoucích koloniích (Obr. 1). Podílel jsem se též na přípravě

vzorků týkajících se regulace Ato proteinů pro konfokální mikroskopii a western blot analýzu. Participoval jsem na sepisování publikace.

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, Vol. 7, No. 13

Divergent branches of mitochondrial signaling regulate specific genes and the viability of specialized cell types of differentiated yeast colonies

Kristýna Podholová[1,*], Vítězslav Plocek[1,*], Stanislava Rešetárová[2], Helena Kučerová[1,2], Otakar Hlaváček[2], Libuše Váchová[2] and Zdena Palková[1]

[1] Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

[2] Institute of Microbiology of the CAS, v.v.i., Prague, Czech Republic

[*] The authors have contributed equally to this paper

Correspondence to: *Zdena Palková*, ***email***: *zdenap@natur.cuni.cz*

Keywords: mitochondrial retrograde signaling, development and differentiation, ageing and longevity

Received: *October 05, 2015* ***Accepted***: *February 23, 2016* ***Published***: *March 15, 2016*

ABSTRACT

Mitochondrial retrograde signaling mediates communication from altered mitochondria to the nucleus and is involved in many normal and pathophysiological changes, including cell metabolic reprogramming linked to cancer development and progression in mammals. The major mitochondrial retrograde pathway described in yeast includes three activators, Rtg1p, Rtg2p and Rtg3p, and repressors, Mks1p and Bmh1p/Bmh2p. Using differentiated yeast colonies, we show that Mks1p-Rtg pathway regulation is complex and includes three branches that divergently regulate the properties and fate of three specifically localized cell subpopulations via signals from differently altered mitochondria. The newly identified RTG pathway-regulated genes *ATO1/ATO2* are expressed in colonial upper (U) cells, the cells with active TORC1 that metabolically resemble tumor cells, while *CIT2* is a typical target induced in one subpopulation of starving lower (L) cells. The viability of the second L cell subpopulation is strictly dependent on RTG signaling. Additional co-activators of Rtg1p-Rtg3p specific to particular gene targets of each branch are required to regulate cell differentiation.

INTRODUCTION

Mitochondrial retrograde signaling is a conserved mechanism that governs cell metabolic adaptation to altered mitochondrial functions, often preventing cell death, as described in mammals and yeast [1]. In both organisms, retrograde signaling can be triggered by changes causing a decrease in mitochondrial membrane potential (such as defects in respiratory chain components or mtDNA mutations) and by elevated reactive oxygen species (ROS) [2-4]. In mammals, various disorders often related to cancer have been linked with cell metabolic and physiological changes because of signaling from mitochondria. For example, retrograde signaling can cause pleiotropic cell changes linked with the upregulation of genes involved in tumorigenic pathways, such as the activation of different oncogenic factors, regulators and metabolic enzymes involved in the metabolic switch to aerobic glycolysis in tumor cells [4, 5]. A number of different factors in different mammalian cell types are involved in retrograde signaling; however, Ca^{2+} is assumed to be a key molecule at present [2, 4, 6].

The major mitochondrial retrograde signaling pathway described thus far in yeast includes three activators, Rtg1p, Rtg2p and Rtg3p, and is hence referred to as RTG pathway. Rtg1p and Rtg3p together form a heterodimeric transcription activator, the translocation of which from the cytosol to the nucleus is activated by Rtg2p [7]. Rtg2p mediates signals from mitochondria with reduced functions, e.g., due to various DNA mutations in the case of respiratory deficient mutants. Three negative regulators, Mks1p, Bmh1p and Bmh2p, which are involved in retaining the Rtg1p-Rtg3p complex in the cytosol, have been described [8, 9] as well as negative regulation of the RTG pathway *via* active TORC1 [10-12]. In addition, RTG gene-independent mitochondria-to-nucleus signaling has been proposed in yeast [13, 14]. Bioinformatics analysis has shown that the mammalian

heterodimer Myc-Max, of which the basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor Myc is often activated during retrograde signaling, has structural homology to the Rtg1p-Rtg3p heterodimer [15]. Hence, the Myc-Max heterodimer, together with its upstream regulator NF-κB, is positioned in a retrograde signaling pathway in mammals in parallel to Rtg1p-Rtg3p in yeast [15, 16]. Homologs of Rtg2p have not yet been identified in metazoans. RTG signaling is linked with the metabolic reprogramming involved in yeast adaptation to mitochondrial dysfunctions by the activation of anaplerotic reactions and peroxisomal functions such as the glyoxylate cycle [13, 17]. The *CIT2* gene, encoding the peroxisomal isoform of citrate synthase, is the typical target gene whose expression is induced by RTG signaling [18].

Yeast colonies have become an excellent model for the investigation of processes involved in the differentiation of cells and the development of specific cell types [19]. When growing on solid complex respiratory medium, yeast giant colonies (colonies derived from a drop of cell suspension spotted on the agar) as well as microcolonies (colonies derived from single cells) pass through distinct developmental phases that can be detected by monitoring the pH changes of the medium, changing from the acidic to near alkali and vice versa [20-22]. The alkali phase of colony development is accompanied by the production of volatile ammonia that functions as a signal important for colony metabolic reprogramming and long term survival [20, 23, 24]. Two major cell types (U cells in upper regions and L cells in lower regions) have been identified in alkali-phase colonies [22, 25]. Both of these cell types originate from mostly non-dividing cell progenitors that form colonies in the acidic phase preceding the ammonia signaling period [25, 26]. U cells, which have a stress-resistant and longevity phenotype, active TORC1, active autophagy, ammonia production, aerobic glycolysis and high glutamine content, resemble mammalian tumor cells [25, 27]. In contrast, L cells exhibit features of starving cells; L cells are also sensitive to stresses and lose viability more quickly during colony aging than U cells. L cells potentially provide nutrients to U cells *via* a nutrient flow cycle similar to the Cori cycle and glutamine-ammonium cycle described between cells of solid tumors and other tissues of tumor-affected mammalian organisms [25, 27].

One of the prominent differences between U and L cells involves mitochondria and respiration. U cells, although localized to upper parts of colonies situated close to the air, decrease their capability to respire almost to the level typical of fermenting cells and harbor large swollen mitochondria [22, 25]. Reduced respiration could contribute to another typical feature of U cells, which is a negligible level of ROS in these cells. The ROS level in U cells is even lower than that in the cells of younger acidic phase colonies [24]. In contrast, L cells are capable of respiration and contain normal-looking mitochondria [22, 25]. The ROS level in L cells is elevated during the alkali period of colony development.

Here, we show that mitochondrial signaling is mediated by the three different branches of the RTG pathway that are involved in cell differentiation within the colonies, in the expression of specific genes and in the viability of particular cell subpopulations. We show that in addition to major U/L cell differentiation, smaller cell subpopulations are formed within L cells and that their survival depends differently on RTG pathway activity. In addition to *CIT2*, we identified two of the three *ATO* genes (*ATO1* and *ATO2*) involved in ammonia signaling as target genes regulated by one of the RTG signaling branches, and we identified the differences in the manner by which the RTG pathway regulates different genes in specific cell subpopulations within differentiated colonies. We also show that Mks1p, a negative regulator of the RTG pathway, contributes differently to divergent branches of RTG regulation of specific genes in colonies.

RESULTS

RTG pathway dysfunction decreases the viability of the specific subpopulation of L cells

With the aim of analyzing possible function(s) of the RTG signaling pathway in developing colonies, we prepared a series of strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (wt) with individually deleted genes involved in the RTG signaling cascade. We deleted genes for the activators Rtg1p, Rtg2p and Rtg3p and for the major negative regulators identified thus far, i.e., Mks1p, Bmh1p and Bmh2p. Colonies of all knockout (KO) strains (Table 1) were able to pass through the same developmental phases as colonies of the wt strain, although colonies of the BY-*rtg1*, BY-*rtg2* and BY-*rtg3* strains exhibited slightly slower growth than wt colonies, which caused a slight delay in colony entry to the alkali phase (Figure 1A). A more prominent growth delay was evident in BY-*mks1* colonies. The growth of BY-*bmh1* and BY-*bmh2* colonies was similar to that of wt colonies, which is consistent with findings that Bmh1p and Bmh2p can substitute for each other. Preparation of the *BMH1*/*BMH2* double KO strain was unsuccessful, indicating synthetic lethality of the double deletion, as described in some strain backgrounds [28, 29]. Microscopic analysis of cross-sections of 15-day-old giant colonies using Nomarski contrast showed that all colonies differentiated into U and L cells with typical morphological features. However, in contrast to wt colonies, in colonies formed by the BY-*rtg1*, BY-*rtg2* and BY-*rtg3* strains, a large subpopulation of dead shrunk cells (the cells with reduced cellular content) appeared in the lower layers of the L cell population (Figures 1B and S1). These cells were

Table 1: Yeast strains used in this study.

name	genotype	source
BY4742	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0	Euroscarf
BY-*rtg1*	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg1::nat	this study
BY-*rtg2*	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg2::nat	this study
BT-*rtg3*	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg3::nat	this study
BY-*mks1*	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat	this study
BY-*bmh1*	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, bmh1::nat	this study
BY-*bmh2*	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, bmh2::nat	this study
BY-*mks1rtg1*	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg1::hph	this study
BY-*mks1rtg2*	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg2::hph	this study
BY-*mks1rtg3*	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg3::hph	this study
BY-Ato1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, ATO1-yEGFP-nat	this study
BY-Ato2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, ATO2-yEGFP-nat	this study
BY-Ato3p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, ATO3-yEGFP-nat	this study
BY-*rtg1*-Ato1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg1::nat, ATO1-yEGFP–kanMX	this study
BY-*rtg1*-Ato2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg1::nat, ATO2-yEGFP–kanMX	this study
BY-*rtg1*-Ato3p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg1::nat, ATO3-yEGFP–kanMX	this study
BY-*rtg2*-Ato1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg2::nat, ATO1-yEGFP–kanMX	this study
BY-*rtg2*-Ato2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg2::nat, ATO2-yEGFP–kanMX	this study
BY-*rtg2*-Ato3p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg2::nat, ATO3-yEGFP–kanMX	this study
BY-*rtg3*-Ato1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg3::nat, ATO1-yEGFP–kanMX	this study
BY-*rtg3*-Ato2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg3::nat, ATO2-yEGFP–kanMX	this study
BY-*rtg3*-Ato3p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg3::nat, ATO3-yEGFP–kanMX	this study
BY-*mks1*-Ato1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, ATO1-yEGFP–kanMX	this study
BY-*mks1*-Ato2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, ATO2-yEGFP–kanMX	this study
BY-*mks1*-Ato3p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, ATO3-yEGFP–kanMX	this study
BY-*bmh1*-Ato1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, bmh1::nat, ATO1-yEGFP–kanMX	this study
BY-*bmh1*-Ato2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, bmh1::nat, ATO2-yEGFP–kanMX	this study
BY-*bmh1*-Ato3p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, bmh1::nat, ATO3-yEGFP–kanMX	this study
BY-*bmh2*-Ato1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, bmh2::nat, ATO1-yEGFP–kanMX	this study
BY-*bmh2*-Ato2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, bmh2::nat, ATO2-yEGFP–kanMX	this study
BY-*bmh2*-Ato3p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, bmh2::nat, ATO3-yEGFP–kanMX	this study
BY-*mks1rtg1*-Ato1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg1::hph, ATO1-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg1*-Ato2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg1::hph, ATO2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg1*-Ato3p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg1::hph, ATO3-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg2*-Ato1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg2::hph, ATO1-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg2*-Ato2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg2::hph, ATO2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg2*-Ato3p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg2::hph, ATO3-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg3*-Ato1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg3::hph, ATO1-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg3*-Ato2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg3::hph, ATO2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg3*-Ato3p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg3::hph, ATO3-yEGFP-kanMX	this study
BY-Cit2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, CIT2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*rtg1*-Cit2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg1::nat, CIT2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*rtg2*-Cit2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg2::nat, CIT2-yEGFP-kanMX	this study

BY-*rtg3*-Cit2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rtg3::nat, CIT2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1*-Cit2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, CIT2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*bmh1*-Cit2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, bmh1::nat, CIT2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*bmh2*-Cit2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, bmh2::nat, CIT2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg1*-Cit2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg1::hph, CIT2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg2*-Cit2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg1::hph, CIT2-yEGFP-kanMX	this study
BY-*mks1rtg3*-Cit2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mks1::nat, rtg1::hph, CIT2-yEGFP-kanMX	this study
BY-Rtg1p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, RTG1-yEGFP-kanMX	this study
BY-Rtg2p-GFP	*MAT*α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, RTG2-yEGFP-kanMX	this study

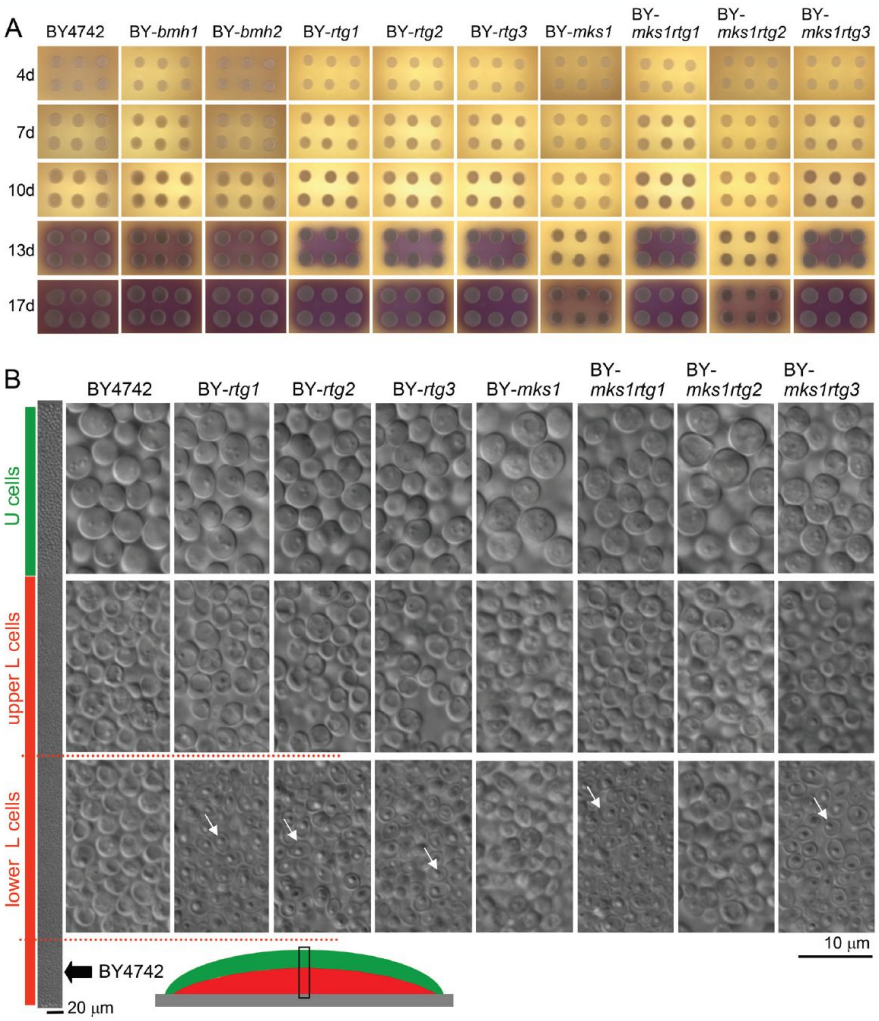


Figure 1: Development and differentiation of yeast colonies formed by wt and KO strains. A. Colony development and signaling. Colonies were grown on GMA with pH indicator bromcresol purple (yellow at lower pH, turning violet at higher pH, pKa value of ~ 6.3). Violet indicates the start of the alkali phase. **B.** Morphology of differentiated cells of 17-day-old colonies (in alkali developmental phase) shown on vertical cross-sections of giant colonies. The leftmost panel shows a segment of a cross-section (the position of which is depicted below using a schematic view of a colony cross-section) from a BY4742 colony to show the position of particular cell types in wt colonies. U cells are marked by green, and L cells are marked by red bars. The dotted red line shows the approximate position of the lower L cells, the viability of which is decreased in *rtg*Δ strains. White arrows indicate examples of dead cells.

phenotypically similar to the yeast cells undergoing regulated cell death that have been identified in colonies [24]. These data showed that the inability to activate the RTG pathway negatively affects the survival of L cells and that the L cell population is not homogeneous but that smaller subpopulations exist that behave differently in certain aspects.

Rtg proteins and Mks1p regulate Cit2p production specifically in upper layers of L cells

The gene *CIT2* is one of the typical targets of the RTG pathway described thus far. Our aim was to analyze the potential expression of *CIT2* directly in cell subpopulations of developing colonies. Therefore, we prepared strains containing the genomic *CIT2* gene fused with the gene encoding GFP, thus producing the Cit2p-GFP protein tagged on its C terminus, which was derived from the above-described wt and KO strains (Table 1). Colonies of all constructed strains were first analyzed in terms of their morphology, differentiation and alkalization, demonstrating that *CIT2* fusion with GFP did not affect colony development (data not shown). Alkali-phase microcolonies (4-day-old) and giant colonies (17-day-old) of constructed strains were then analyzed by two-photon excitation confocal microscopy (2PE-CM) and wide-field microscopy, respectively. Cit2p-GFP was detected in cell subpopulations localized to the upper layers of L cells of both colony types, i.e., to the subpopulation that differed from the dying L cell subpopulation present in colonies of strains with deleted *RTG* genes (Figures 2 and S2). Cit2p-GFP production in any of the colony subpopulations

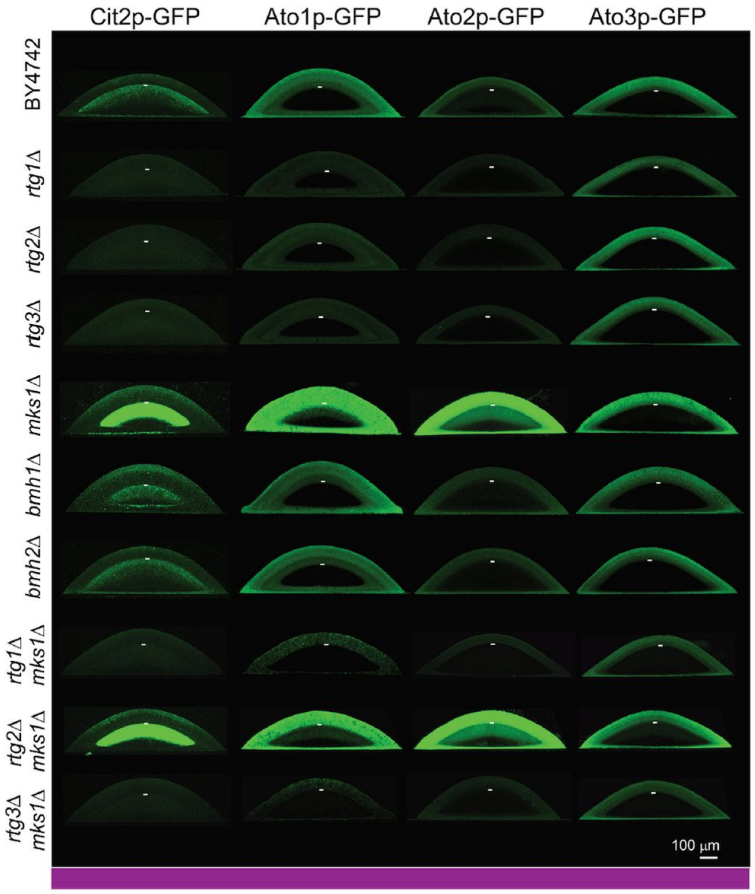


Figure 2: Production of Cit2p, Ato1p, Ato2p and Ato3p fused with GFP within differentiated colonies of wt and KO strains occurring in alkali phase. Localization of the indicated protein is visualized as green fluorescence on vertical colony cross-sections of 4-day-old microcolonies (occurring in full alkali developmental phase, as marked by the violet bar) by 2PE-CM. The same confocal microscopy setup was used for all colonies (wt and KO) producing the indicated protein. Thus, the intensity of the fluorescence roughly reflects changes in the level of the indicated protein in colonies of different strains. Approximate position of the border between U and L cells in individual colonies is indicated by the short white lines.

was fully dependent on the presence of any of the three *RTG* genes. The absence of Mks1p (but not the individual absence of Bmh1p or Bmh2p) dramatically increased the Cit2p level, specifically in the upper layers of L cells of the microcolonies, while the effect of *mks1*Δ on the Cit2p-GFP level in the upper L cells of chronologically older giant colonies was negligible (data not shown). The absence of Mks1p did not cause any Cit2p production in either U cells or lower layers of L cells of both colony types.

To obtain more precise Cit2p quantification in particular subpopulations, we separated 5 layers of cells from differentiated giant colonies of the wt and KO strains and compared the Cit2p-GFP levels by Western blot (WB) analysis (Figure 3A). Consistent with the microscopy results, the highest levels of Cit2p-GFP were found in the upper layers of L cells and in cells at the border between the U and L cells. U cells contained high levels of free GFP, indicating efficient Cit2p-GFP degradation most likely by autophagy, which is active in U cells [25]. The amount of degradation decreased toward the lower layers of colonial cells. No GFP fluorescence was detected in the lower layers of L cells (Figure 2), which, together with the low signal of Cit2p-GFP and free GFP in WBs of separated cells (Figure 3A), confirmed that Cit2p is not synthesized in these cells. The borders between WB fractions were less sharp than the borders observed by microscopy because of slight cross-contamination of the fractions of separated cell layers (Figure 3A). In addition, the low amount of free GFP detected in fraction 5 could also partly originate from the thin layer (of one to three cells) of cells resembling U cells always visible at the bottom of the colony [25, 30].

Rtg proteins and Mks1p regulate Ato1p and Ato2p production specifically in U cells

Ato proteins are prominent markers of U cells [25, 30]. When screening for *ATO* gene expression in the absence of different transcription regulators (unpublished data), we identified a positive effect of Rtg proteins on *ATO1* expression. Therefore, we prepared a series of strains individually producing Ato1p-GFP, Ato2p-GFP or Ato3p-GFP derived from *RTG* gene KO strains (Table 1). C-terminal tagging of *ATO* genes does not affect the functions of their encoded proteins [31], as confirmed by analyzing the colonies of all constructed strains (data not shown). Microscopic analysis of Ato-GFP level in situ within alkali-phase microcolonies and giant colonies showed that Ato1p-GFP and Ato2p-GFP production in U cells depends on the function of all three *RTG* genes, while Ato3p-GFP production occurs normally in colonies of KO strains with any *RTG* gene deletion (Figures 2 and S3). The absence of Mks1p increased the levels of Ato1p-GFP and Ato2p-GFP not only in U cells of both colony types but also in upper layers of L cells, i.e., in the layers where Cit2p-GFP is typically produced. The precise quantification of Ato-GFP proteins in separated U and L cell subpopulations by WB analysis fully confirmed the differences observed by microscopy (Figure 4A). The WBs also showed that in contrast to Cit2p production, which was completely abolished in the absence of any of the Rtg proteins, basal levels of Ato1p-GFP and Ato2p-GFP remained present in U cells from *rtg*Δ colonies. Interestingly, the absence of the repressor Mks1p also slightly increased the Ato3p-GFP level in L cells (Figure 4A). The *ATO1* and *ATO2* mRNA levels in microcolonies of wt and KO strains (Figure S4A) differed consistently with the effect of the presence/absence of these regulators on Ato1p-GFP and Ato2p-GFP protein amounts. This result confirmed that Rtg/Mks1p regulate *ATO1* and *ATO2* expression in colonies at the transcriptional level.

The repressor Mks1p functions dependent and independent of the RTG pathway

The above data showed that the repressor Mks1p affects different gene targets in different cell subpopulations. To determine whether Mks1p affects the expression of these genes strictly *via* repression of the RTG pathway, we prepared an additional set of strains derived from the BY-*mks1*-Cit2p-GFP, BY-*mks1*-Ato1p-GFP, BY-*mks1*-Ato2p-GFP and BY-*mks1*-Ato3p-GFP strains, each of which had an additional deletion of one of the three *RTG* genes (Table 1). Then, the levels of Cit2p-GFP and Ato-GFP proteins in individual colony subpopulations were analyzed in situ within microcolonies by 2PE-CM. The deletion of either the *RTG1* or *RTG3* gene in BY-*mks1*-Cit2p-GFP eliminated Cit2p-GFP from the colonies. In contrast, the deletion of *RTG2* had no effect, as the Cit2p-GFP level was comparable with the Cit2p-GFP level in the BY-*mks1*-Cit2p-GFP strain (Figure 2). Thus, *CIT2* expression in colonies is fully under the control of the Mks1p-RTG pathway and is directed through signaling from mitochondria *via* Rtg2p.

The deletion of the *RTG1* or *RTG3* gene in *mks1*Δ strains eliminated the production of Ato1p-GFP and Ato2p-GFP in the upper layers of L cells and significantly diminished the production of both proteins in U cells (Figures 2 and 4B). However, the levels of Ato1p-GFP in the U cells of *mks1*Δ/*rtg1*Δ and *mks1*Δ/*rtg3*Δ colonies remained slightly but significantly higher than the levels of Ato1p-GFP in the U cells of *rtg1*Δ and *rtg3*Δ colonies as shown by WBs (Figure 4B). The deletion of the *RTG2* gene did not affect the high Ato1p-GFP and Ato2p-GFP levels typical of *mks1*Δ colonies or the slightly increased Ato3p-GFP level in upper L cells of BY-*mks1*-Ato3p-GFP colonies (Figures 2 and 4B). These data demonstrated that the Mks1p-RTG pathway is the major pathway that activates Ato1p and Ato2p production in U cells *via* Rtg2p-mediated signaling from mitochondria. In addition,

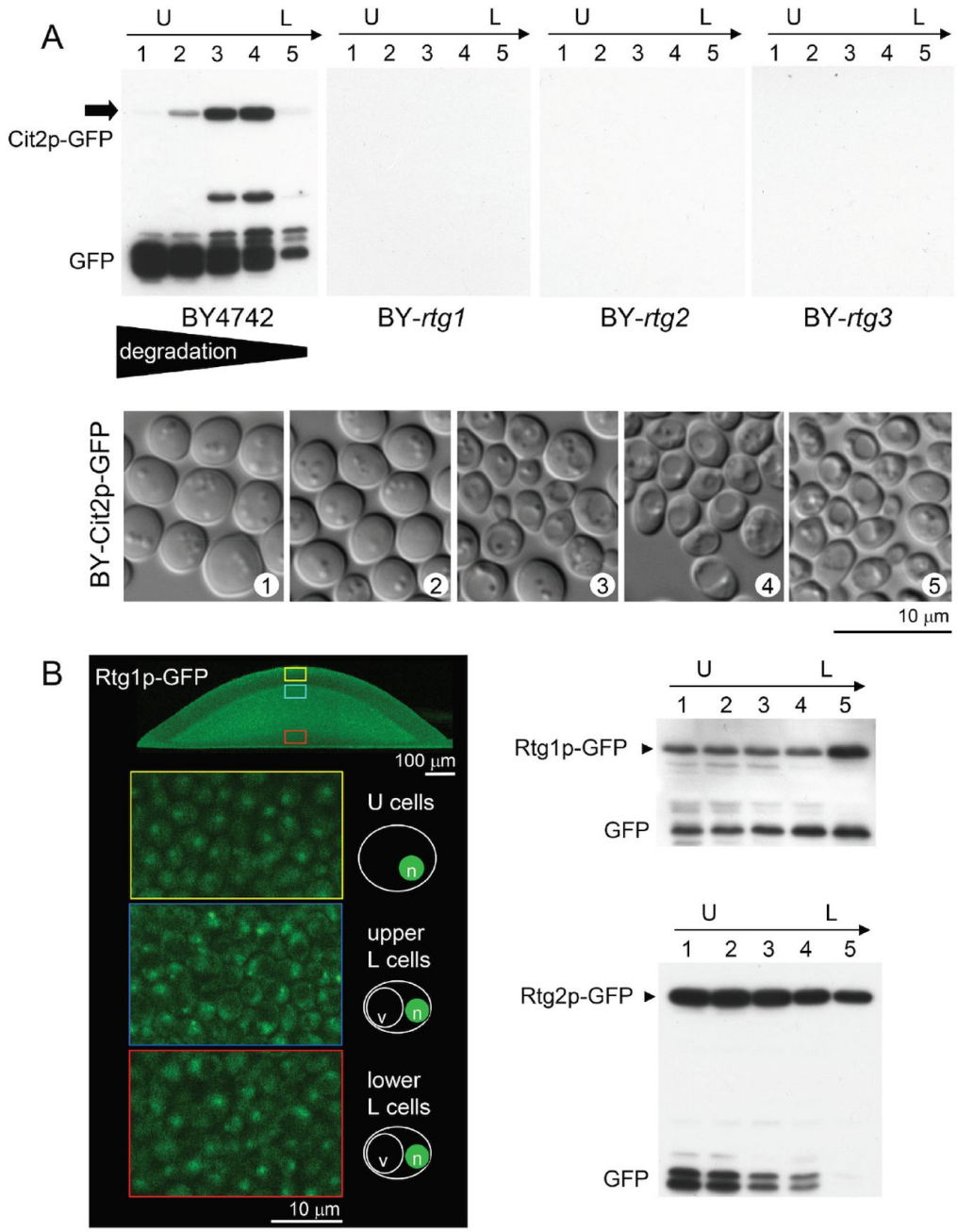


Figure 3: Comparison of amounts of Cit2p-GFP, Rtg1p-GFP and Rtg2p-GFP in different subpopulations of giant colonies. A. WB analysis of the amount of Cit2p-GFP in 5 cell layers (1-5) separated from 14-day-old alkali phase colonies formed by wt and *rtg*Δ strains, starting from the top of the colony (i.e., from upper U cells, layer 1) and ending at the lowest layers of L cells near the agar. The lower panel shows the morphology of cells from layers 1-5 separated from wt colonies producing Cit2p-GFP that were used for WB analysis. **B.** Left panel, localization of Rtg1p-GFP in cells from microcolonies (4-day-old) of colony cross-sections as determined by 2PE-CM. Nuclear localization in U cells and in both types of L cells is shown on magnified images marked in color in colony cross-sections. Right panels, comparison of Rtg1p-GFP and Rtg2p-GFP amounts in 5 cell layers (1-5 as in A) of 14-day-old alkali-phase wt colonies by WB. Loading controls are in Figure S5.

these data showed that Mks1p partially represses the *ATO1* gene in U cells, independent of the RTG pathway.

Rtg proteins and Mks1p regulate the viability of lower L cells

Neither Cit2p-GFP nor Ato-GFP production nor any *mks1*Δ effect on the production of these proteins was observed in the lower layers of L cells, the viability of which was significantly decreased in the absence of any of the *RTG* genes. This finding implied that another branch of the RTG pathway is active in these cells and regulates other currently unknown target(s). To determine whether the Rtg1p-Rtg3p transcription regulator localizes to the nuclei of these cells and the level of Rtg2p, we prepared strains producing Rtg1p or Rtg2p labeled with GFP. Then, we analyzed Rtg1p-GFP cellular localization in situ within the colonies by 2PE-CM and Rtg1p-GFP and Rtg2p-GFP levels in different cell subpopulations separated from the colonies by WBs. Figure 3B shows that Rtg1p-GFP is present in the nuclei of all colonial cells, including lower L cells, and that a relatively high level of Rtg2p is present in all cell subpopulations.

The deletion of *MKS1*, which possibly results in hyperactivation of the RTG pathway at the beginning of colony development, caused a partial growth defect in colonies. This defect was reversed by additional deletion

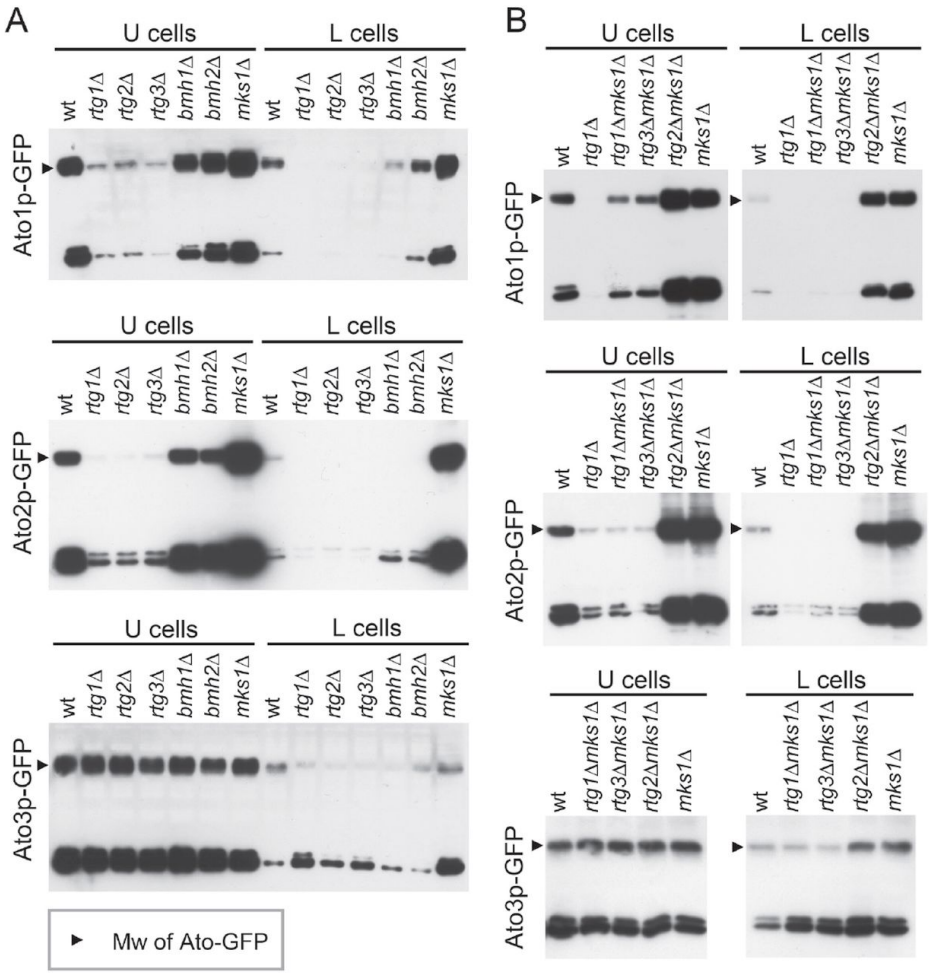


Figure 4: Comparison of amounts of Ato proteins in U and L cells from giant colonies of wt and KO strains. Levels of Ato1p-, Ato2p- and Ato3p-GFP in U and L cells separated from 14-day-old giant colonies formed by wt and KO strains were determined by WB. Ato-GFP, upper band; GFP, a product of Ato-GFP degradation, lower band. **A.** Comparison of wt colonies and colonies of strains with individual deletion of regulators involved in the RTG pathway. **B.** Comparison of wt colonies and colonies of strains with double deletions of *RTG* and *MKS1* genes. Loading controls are in Figure S5.

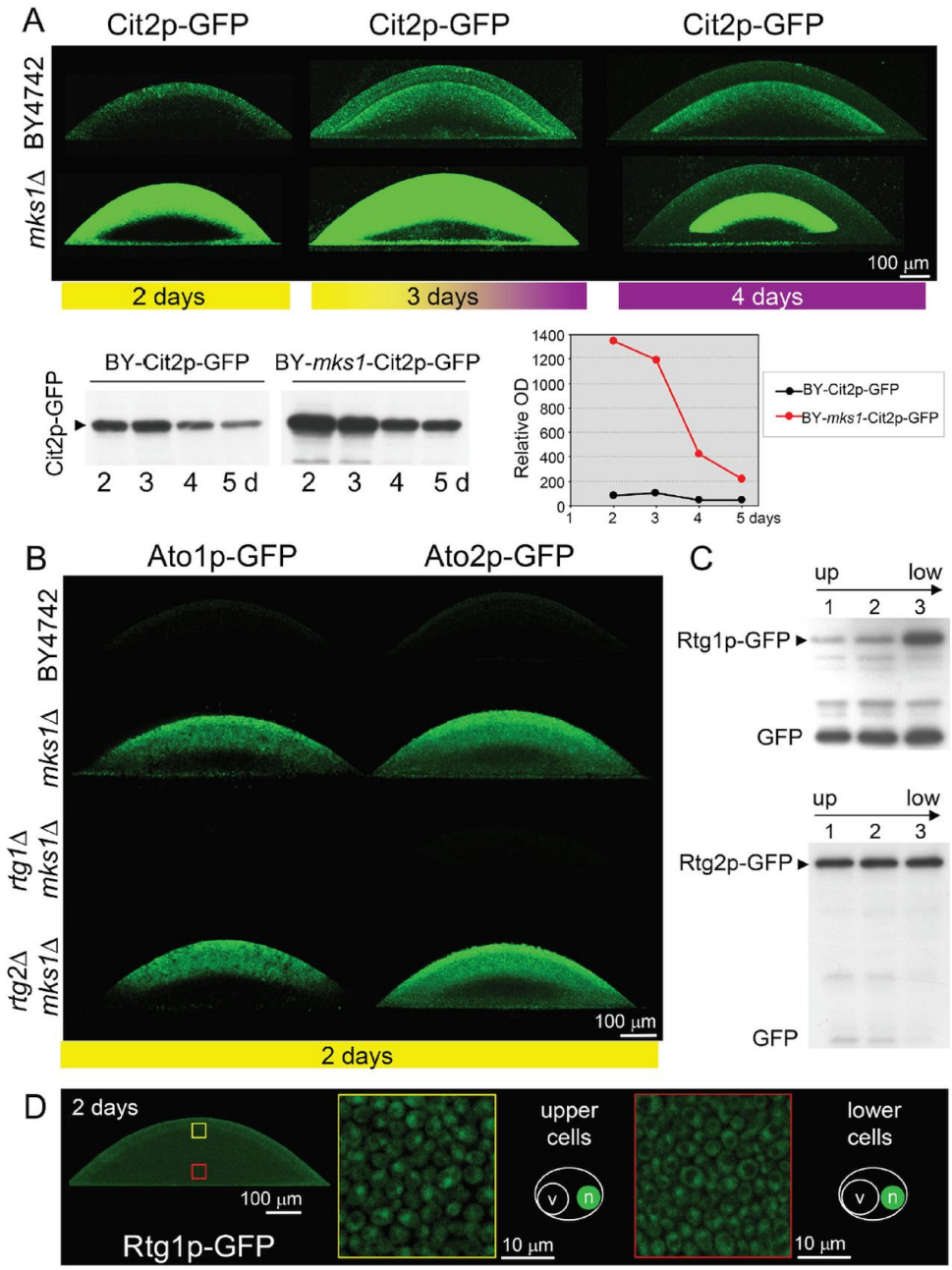


Figure 5: Effect of developmental phase on the production and localization of Ato1p, Ato2p, Cit2p, Rtg1p and Rtg2p in cells of colonies of different strains. A. Levels and localization of Cit2p-GFP within colonies occurring in acidic phase (left, yellow bar), immediately upon entering the alkali phase (center) and during the alkali phase (right, violet bar). Changes in the Cit2p-GFP levels in whole microcolonies of wt and *mks1*Δ strains during the interval of 2-5 days are shown below by WB analysis (left) and are quantified in the graph (right). **B.** Ato1p-GFP and Ato2p-GFP levels and localization within 2-day-old microcolonies occurring in acidic phase (marked by a yellow bar below the image) as determined by 2PE-CM. **C.** Amounts of Rtg1p-GFP and Rtg2p-GFP in three layers (starting from the top of the colony, layer 1) separated from 6-day-old acidic-phase giant colonies. **D.** Localization of Rtg1p-GFP in cells from 2-day-old microcolonies as determined by 2PE-CM. Up, upper part of the colony; low, lower part of the colony. Loading controls (for A and C) are in Figure S5.

of *RTG1* or *RTG3*, but not of *RTG2* (Figure 1A), which confirmed that premature RTG signaling is responsible for slower colony growth and not for other RTG-independent Mks1p function(s). In contrast, the subpopulation of dead L cells was not present in colonies of the BY-*mks1* and BY-*mks1rtg2* strains with a hyperactive RTG pathway. However, this dead cell subpopulation was found in the BY-*mks1rtg1* and BY-*mks1rtg3* strains, similar to that of colonies of strains with deletions of any single *RTG* gene (Figure 1B). Hence, premature hyperactivation of the RTG pathway in young colonies not yet reaching starvation negatively affects the subsequent overall growth of colonies, whereas the inability to activate the RTG pathway later during colony aging (most likely when conditions become worse) causes this specific L cell subpopulation to die.

RTG signaling in acidic-phase colonies

Mks1p-Rtg regulation of different gene targets in the U and L cells of differentiated colonies during the alkali phase is shown above. Next, we determined whether (and, if so, how) *RTG* genes and the repressor Mks1p are involved in the regulation of *CIT2* and *ATO* genes in acidic-phase colonies, i.e., before the formation of fully developed U and L cells. Hence, we analyzed acidic-phase microcolonies of the above-described wt and KO strains by 2PE-CM.

Cit2p-GFP is produced in the upper cell layers of 2-day-old acidic-phase colonies, and this production is partially repressed by Mks1p, as the Cit2p-GFP level was substantially increased in colonies of the BY-*mks1*-Cit2p-GFP strain (Figure 5A). Monitoring the level and localization of Cit2p-GFP during the transition of microcolonies from the acidic to the fully alkali phase (interval from 2 to 4 days of microcolony development) (Figure 5A) showed that Cit2p-GFP is present in both the

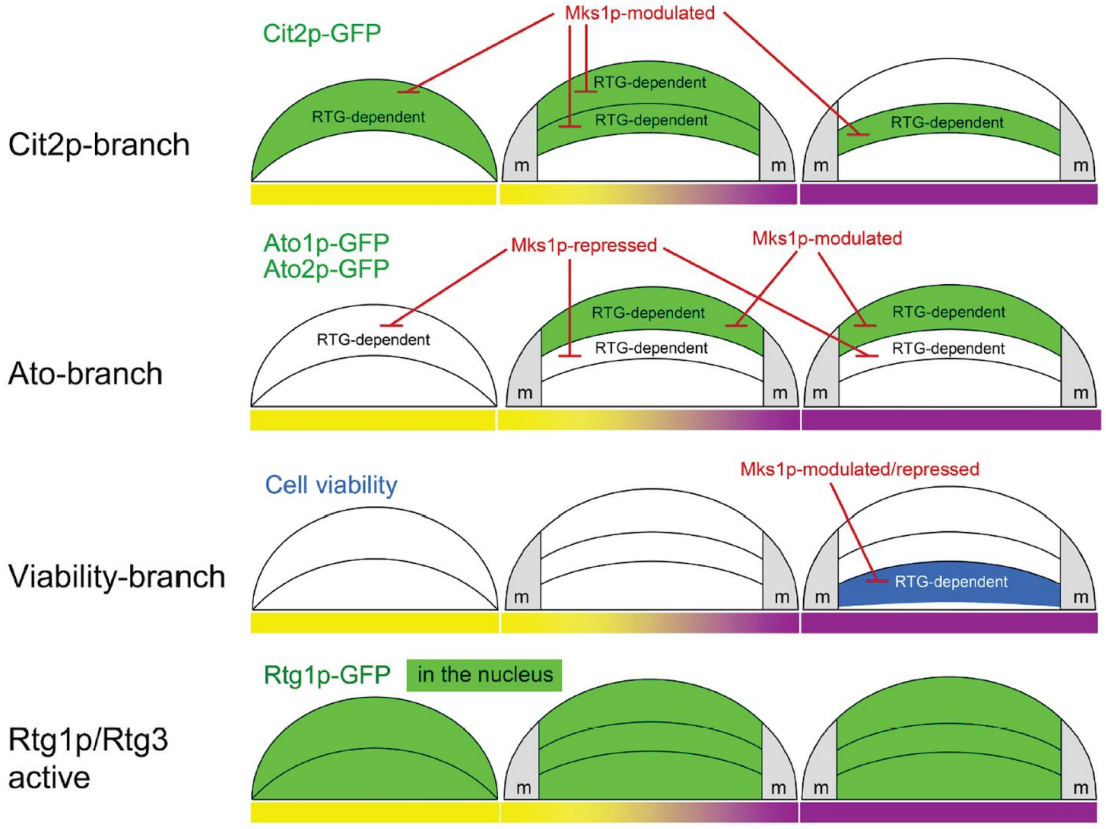


Figure 6: Summary of RTG regulation in developing colonies. Diagrammatic illustrations of the functions of proteins of three branches of the RTG pathway in cell subpopulations localized in different layers of colonies occurring in late acidic (left, yellow bar), early alkali (middle, yellow/violet bar) and fully alkali (right, violet bar) colonies. The repressing or modulating effect of Mks1p on Cit2p and Ato1p/Ato2p production is indicated. m, margin regions of colonies.

upper cell layers and the upper layers of lower cells in the early alkali phase and that the expression level in both regions is partially repressed by Mks1p. WB quantification showed that the repressive effect of Mks1p on *CIT2* expression gradually decreased during the interval from the third to the fifth day of microcolony development (i.e., during the aging of alkali-phase microcolonies). This finding is consistent with the observed negligible effect of *MKS1* deletion on Cit2p-GFP production in L cells of 15-day-old alkali-phase giant colonies.

Consistent with previous results [20, 32], Ato1p-GFP and Ato2p-GFP proteins were not produced in 2-day-old acidic phase microcolonies. However, the level of these proteins was greatly increased in the absence of Mks1p. The positive effect of *mks1*Δ on Ato1p-GFP/Ato2p-GFP production was strictly dependent on the presence of functional *RTG1*/*RTG3* genes and independent of the *RTG2* gene (Figure 5B). No residual Ato1p-GFP or Ato2p-GFP fluorescence was detectable in the absence of *RTG1*/*RTG3* genes in a *mks1*Δ background, which showed that Mks1p is the only repressor of *ATO1* and *ATO2* genes in the upper cell layers of acidic-phase colonies.

As in the alkali phase, Rtg1p-GFP and Rtg2p-GFP were present in all three cell subpopulations separated from acidic-phase giant colonies (Figure 5C) and Rtg1p-GFP localized to nuclei in all cells in these colonies (Figure 5D). These findings indicate additional roles of the RTG pathway in cell subpopulations where Cit2p is not produced.

DISCUSSION

New data revealed that signaling from mitochondria *via* the RTG pathway is crucial in certain stages of the development and differentiation of yeast colonies. The inactivation of this signaling caused lethality to the specific cell subpopulation localized to lower layers of L cells and diminished the production of specific proteins in both U cells (Ato1p and Ato2p) and the upper layers of L cells (Cit2p) as well as in potential ancestors of these cells in acidic-phase colonies (Figure 6). Hence, signaling from mitochondria *via* the RTG pathway plays a role in all subpopulations of fully differentiated colonies and in some of their progenitors; however, the roles are different in particular subpopulations and result in different cell fates. As mitochondria with differently affected functionality are present in U *versus* L cells, the particular functional state of mitochondria could stimulate different targeting of RTG signaling in the three colonial cell subpopulations. The relation of the newly identified branches of RTG regulation to other pathways described previously in U and L cells and to the metabolic properties of these cell types are discussed below and summarized in model scheme (Figure 7).

All three positive activators, Rtg1p, Rtg2p and Rtg3p, as well as the repressor Mks1p are important in every type of mitochondrial signaling in the colonies described in this paper. However, these regulators regulate different gene targets in specific cell subpopulations differently. In U cells, two of the three Ato proteins (the prominent markers of U cells, the production of which is sharply induced when colonies enter alkali phase, [20, 31]) are under major control of RTG signaling, including modulation of the expression of *ATO1* and *ATO2* genes by the repressor Mks1p. This modulation means that the removal of this repressor further enhances the considerable *ATO1* and *ATO2* gene expression levels characteristic of wt U cells. In the acidic phase progenitors of U cells, *ATO1*/*ATO2* expression is completely repressed by Mks1p. In contrast, the expression of the third *ATO* gene *ATO3* is almost unaffected by the RTG pathway in colonies. Because *ATO3* was identified during studies of respiratory deficient yeast strains in liquid cultures as a gene regulated by another uncharacterized mitochondrial signaling pathway [33], *ATO3* expression in colonies could also be regulated by signaling from mitochondria *via* another retrograde pathway independent of the *RTG* genes.

Although RTG signaling is active in U cells, as shown by *ATO1*/*ATO2* expression, the typical RTG pathway target Cit2p is present in upper cells only in acidic-phase colonies and in the early stages of U/L colony differentiation (early alkali phase). Later, in fully differentiated U cells, Cit2p is effectively degraded, and its new synthesis is stopped by an unknown mechanism independent of the repressor Mks1p because deletion of the *MKS1* gene did not increase Cit2p synthesis. At this developmental period, only the upper layers of L cells continue to synthesize the Cit2p protein.

The L cell population is composed of at least two cell subpopulations that exhibit active RTG signaling: the subpopulation in the upper layers of L cells, in which Cit2p production is active, and the subpopulation in the lower L layers, in which the functionality of the RTG pathway is indispensable for cell viability (but not for the production of any of the three RTG-regulated proteins described here). All three *RTG* proteins and the repressor Mks1p are involved in both types of regulation in L cells.

The differences in gene targets regulated by the Mks1p/Rtg pathway in specific cell subpopulations suggest the presence of additional regulators responsible for the diversification of different branches of mitochondrial RTG signaling. For example, Mks1p is functional in both Cit2p expression regions and Ato expression regions because its deletion enhances the production of particular proteins. However, *ATO* gene expression in Cit2p regions is fully blocked by Mks1p, which suggests that Mks1p can either directly repress *ATO1* and *ATO2* (and possibly other genes) or can repress additional currently unknown co-activator(s) of these genes, in addition to its typical negative regulation of the RTG pathway. This potential Mks1p-repressed co-activator can activate its gene targets

only under the conditions of active Rtg1p-Rtg3p (as deletion of *RTG1*/*RTG3* suppresses the *mks1*Δ effect) and thus could contribute to the divergent RTG regulation of specific genes in specific cell subpopulations (Figure 7). In contrast, the expression of *CIT2* in Ato regions is blocked independent of Mks1p (as *mks1*Δ has no effect), which suggests either the presence of an additional *CIT2* repressor or the absence of any putative *CIT2*-specific co-activator of Rtg1p-Rtg3p.

The RTG pathway is activated in U cells by Rtg2p, which most likely detects a signal from dampened ROS-free mitochondria, independent of the fact that U cells are metabolically active cells that contain high levels of glutamine/glutamate and have an active TORC1 pathway [22, 25], which both have been shown to inhibit the RTG pathway in yeast cells in liquid cultures [10-12]. This finding supplements other unusual features of U cells described previously [22, 25], most of which are paralleled in tumor cells of mammals, such as aerobic glycolysis, glutaminolysis, ammonia production and autophagy [27, 34]. The finding that the RTG pathway targets in U cells differ from those activated by the same pathway in starving

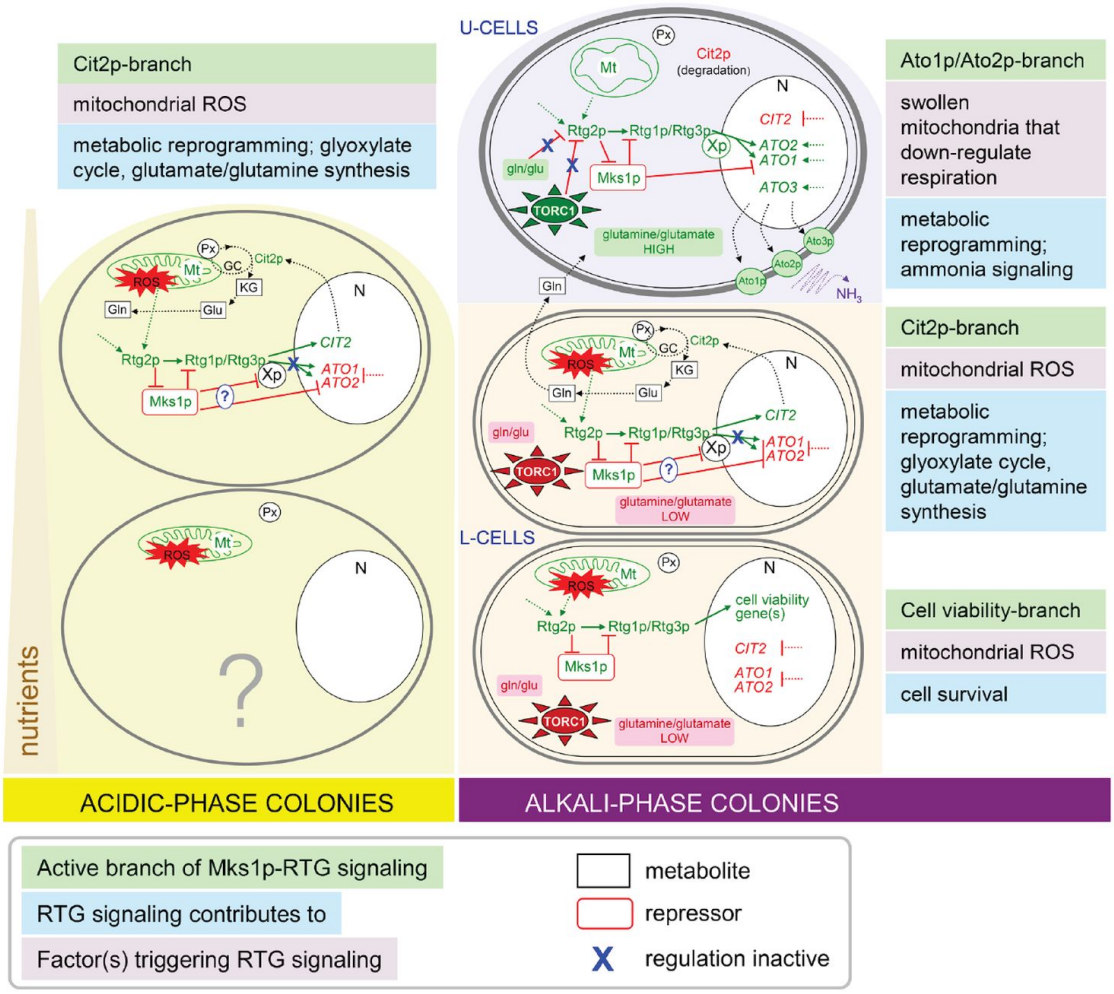


Figure 7: Schematic model of relations among newly identified branches of RTG regulation and other metabolic and regulatory pathways of U and L cells and cells within acidic-phase colonies. Solid green arrows/red lines indicate activation/repression by a known regulator. Dotted green arrows/red lines indicate activation/repression by not yet identified regulator. Dotted black arrows indicate a metabolic process or transport. Genes, proteins, processes or metabolites marked in green are induced/high and those in red are repressed/low in the particular cell type. Expression of *ATO1*/*ATO2* and *CIT2* is repressed and/or activated in particular subpopulations also by additional unknown regulatory proteins. Xp, not yet identified factor co-regulating *ATO1*/*ATO2* expression together with Rtg1p/Rtg3p; Mt, mitochondrion; Px, peroxisomes; N, nucleus; gln, glutamine; glu, glutamate; KG, α-ketoglutarate; GC, glyoxylate cycle.

cells argues for the existence of other signaling branches driven by differently affected mitochondria, which use the same core gene products Rtg/Mks1p but are specialized according to the particular cell type and likely include different additional regulatory elements. This conclusion is supported by the fact that even starving cells such as L cells can differ in terms of the functions of mitochondrial RTG signaling. In one subpopulation, active signaling is represented by *CIT2* expression, and in the second subpopulation, RTG gene functionality is indispensable for cell viability by a yet unknown mechanism. The active RTG pathway in L cells that harbor low levels of glutamate, as well as particularly low levels of glutamine and inactive TORC1, is consistent with the generally accepted model of RTG pathway regulation. In L cells with higher levels of ROS and a starvation phenotype, mitochondria most likely decrease functionality to a level that induces an RTG response, although L cells are capable of respiration when separated from colonies. No direct information regarding mitochondrial respiratory status in situ within colonies is available and, in fact, is difficult to obtain.

RTG signaling is related to metabolic properties of the cell subpopulations and to their interactions during colony development. In yeast, the RTG pathway contributes to changes in the TCA cycle and activation of peroxisomal fatty acid β-oxidation and glyoxylate shunt, resulting in the increased synthesis of glutamate, a precursor of most amino acids [13]. Cit2p is a typical marker protein linked to these changes [35]. Cells localized to the upper regions of younger acidic-phase colonies (i.e., U cell progenitors) produce Cit2p, and a significant Cit2p level persists in newly formed U cells in the early stages of U/L cell differentiation. Hence, the RTG pathway could be involved in the synthesis of glutamate/glutamine before the full differentiation of cells in upper colony layers to typical U cells. After colony differentiation, the Cit2p protein is present predominantly in the upper layers of L cells, i.e., in cells close to the U cells. Previous findings suggested that L cells synthesize and release certain nutrients, including glutamine, to feed U cells [25]. Therefore, we can hypothesize that the preservation of the Cit2p-related branch of RTG signaling, particularly in upper layers of L cells, contributes to such feeding, during which glutamine and glutamate synthesized and released from upper L cells are immediately consumed by U cells. Findings of much higher levels of glutamine/glutamate in U cells compared with L cells [25] support this hypothesis. The second branch of RTG signaling is active in fully differentiated U cells. This branch, most likely with the help of additional co-activators, fulfills other important regulatory tasks independent of Cit2p and related processes that include the sharp induction of *ATO1*/*ATO2* genes, whose products are involved in ammonia signaling; this signaling is crucial for the metabolic reprogramming of U cells and for the differentiation of colonies [20, 24, 25, 36]. Ammonia production is one of the typical features shared by U cells and tumor cells. The third branch of RTG signaling (not accompanied by either Cit2p or Ato production) is related to the viability of the lower L cell subpopulation, i.e., to another fraction of L cells that most likely provide nutrients to U cells. These cells are localized farther from the U cells but closer to the nutritive agar, which could make them important players in nutrient cycling. The observed cell death phenotype of these cells progressed during colony aging, being more prominent in older giant colonies than in faster developing microcolonies (data not shown). This observation is consistent with previous findings that, in contrast to typical features of U cells that are linked to the switching of colonies to alkali phase and independent of the absolute age of colonies, stress- and aging-related features (including a gradual decrease in intracellular amino acids) are more prominent in chronologically older L cells of giant colonies existing longer in the neighborhood of U cells than in the younger L cells of microcolonies [22]. Hence, these new data suggest the intriguing possibility that mitochondrial retrograde signaling is involved in the survival of cells that gradually provide nutrients to other cells and that develop features resembling the cachexia phenotype of mammalian tissues [37] during the aging of differentiated colonies. The clear separation of the Cit2p-related branch of RTG signaling from the viability-related branch also suggests that the positive effect of the RTG pathway on yeast survival in liquid cultures [38] could be less dependent on Cit2p-related metabolic reprogramming than originally supposed.

In conclusion, our novel findings show that the roles of RTG signaling in yeast are far more complex, affect more cellular processes than hitherto anticipated, and involve a number of yet unknown regulatory elements. Divergent branches of active RTG signaling were observed in parallel at the same time-point of colony development; these branches were specific to particular cell-types within differentiated colonies. Other responses appeared at other time-points of colony differentiation. The observed RTG signaling behaviors are triggered by distinct mitochondrial alterations that differ significantly for U, L and other colonial cell types. Multiple mitochondrial alterations most likely reflect complex mitochondrial dynamics related to the metabolic differences among differentiated cell types. The described heterogeneity of RTG signaling in yeast colonies closely resembles the pleiotropic mitochondrial retrograde signaling in mammals, which includes a number of parallel regulatory events occurring under different conditions and in different cells; this signaling is regulated through a variety of largely unknown factors. For example, the retrograde signaling that involves the transcriptional regulator Myc (the protein overexpressed in over 70% of all human cancers and a structural homolog of Rtg1p, [15]) can affect a variety of processes, such as the cell cycle, cell death, cell adhesion and cellular metabolism,

including glutaminolysis and metabolic pathways that provide precursors for biosynthetic reactions [39]. Hence, mitochondrial retrograde signaling is a universal mechanism in eukaryotes from yeast to mammals, and its activation is connected with many cellular metabolic processes, including those leading to pathophysiological changes such as tumorigenesis. The finding of additional regulatory branches, targets and regulatory elements of mitochondrial retrograde signaling using yeast colonies that metabolically resemble tumor-affected organisms thus suggests prospects for the identification of similar elements of retrograde signaling in mammals.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and cultivation

The wt *S. cerevisiae* strain BY4742 (*MATa*, *his3*Δ, *leu2*Δ, *lys2*Δ, *ura3*Δ) was used. The strains with gene deletions and C-terminal GFP fusions (Table 1) used in this study were derived from BY4742 according to [40] and [41] by transforming the cells with DNA cassettes generated by PCR. C-terminal GFP fusion strains were constructed using either GFP-KanMX or GFP-nat integrative cassette amplified by PCR from plasmid pKT127 or pOH11, respectively. Knockout strains were prepared using plasmids pUG6+25 (nat^r), pUG6 (kan^r) and pUG6+32 (hph^r) (obtained from EUROSCARF collection). Yeast cells were transformed as described in [42].

Giant yeast colonies were grown (six per plate) at 28°C on GMA (1% yeast extract, 3% glycerol, 1% ethanol, 2% agar, and 10 mM $CaCl_2$, with or without the pH indicator bromocresol purple). Microcolonies were grown at an approximate density of 5×10^3 per plate.

Colony imaging to monitor growth and development

Colony images were captured in incident and/or transmitted light. A ProgRes® CT3 CMOS camera with a Navitar objective and the NIS Elements software (Laboratory Imaging) were used.

Separation of cells from differentiated colonies and determination of protein amounts by WBs

Particular cell layers, three from acidic phase colonies and five or two (U and L cells) from alkali phase colonies were stepwise harvested from colonies by micromanipulation. Presence of individual cell-types (and the purity of the fractions) was controlled by microscopy using Nomarski contrast as shown in Figure 3A (for five cell layers). The detection of GFP tagged proteins in the fractions by Western blots was performed as described previously [32]. In brief, cells were broken by glass beads, and proteins of cell lysates were subjected to SDS-PAGE. After the proteins were transferred to a PVDF membrane, GFP was detected by mouse monoclonal horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-GFP antibody (Santa Cruz). The peroxidase signal was visualized using Super Signal West Pico (Pierce) on Super RX medical X-ray film (Fuji). The levels of the individual proteins were evaluated by UltraQuant 6.0. To minimize the effect of band saturation, less exposed WBs were usually used for quantification; the quantification of the most concentrated samples could be partially affected by their saturation. Membranes stained by Commassie blue were used as loading controls (Figure S5).

RNA isolation and northern blotting

Microcolonies (2- and 5-day-old) were collected and suspended in TES buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS). Total RNA was isolated using the hot phenol method [20]. The total RNA concentration was quantified with a spectrophotometer (Unicam Helios Gamma). Fifteen micrograms of total RNA were denatured in loading buffer with formamide, separated in 1.5% agarose gel and then transferred to a positively charged nylon membrane (Amersham Hybond™-XL, GE Healthcare Ltd). The membranes were hybridized with specific DNA probes prepared using a random primer labeling kit (Takara). The PCR fragments of *ATO1, ATO2* and *CIT2* were labeled with [α-^{32}P] dCTP. The rRNA content was visualized by ethidium bromide staining and used as a loading control (Figure S4B).

Microscopic analysis of cells within the colony structure

Microcolonies were visualized by 2PE-CM according to [30]. In brief, colonies were embedded in low-gelling agarose and cut vertically down the middle. The cut surface was placed on a coverslip, and colony side views were obtained by 2P-CM. A true confocal scanning microscope (SP2 AOBS MP; Leica) was used, fitted with a mode-locked laser (Ti:Sapphire Chameleon Ultra; Coherent Inc.) for two-photon excitation and 20×/0.70 and 63×/1.20 water immersion plan Apochromat objectives. An excitation wavelength of 920 nm was used, and the GFP fluorescence signal was recorded in non-descanned mode, in which the light was collected directly behind the objective by the external PMT4 detector after passing through an E700SP short pass filter (F1), followed by a 525DF25 band pass filter (F2). Images of microcolonies older than 2 days were composed of two stitched fields of view.

The visualization of giant colony cross-sections was performed according to [25]. In brief, intact colonies were embedded in 2% agarose gel and sectioned using a Leica VT1200S vibrating microtome. Sections (20 μm) from central colony parts or individual cells separated from colonies by micromanipulation were examined using Leica DMR and Carl Zeiss Axio Observer.Z1 fluorescence microscopes with a GFP filter or DIC. DIC visualization was used for determination of presence of shrunk dead cells lacking most of the intracellular material as shown previously [24].

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

GRANT SUPPORT

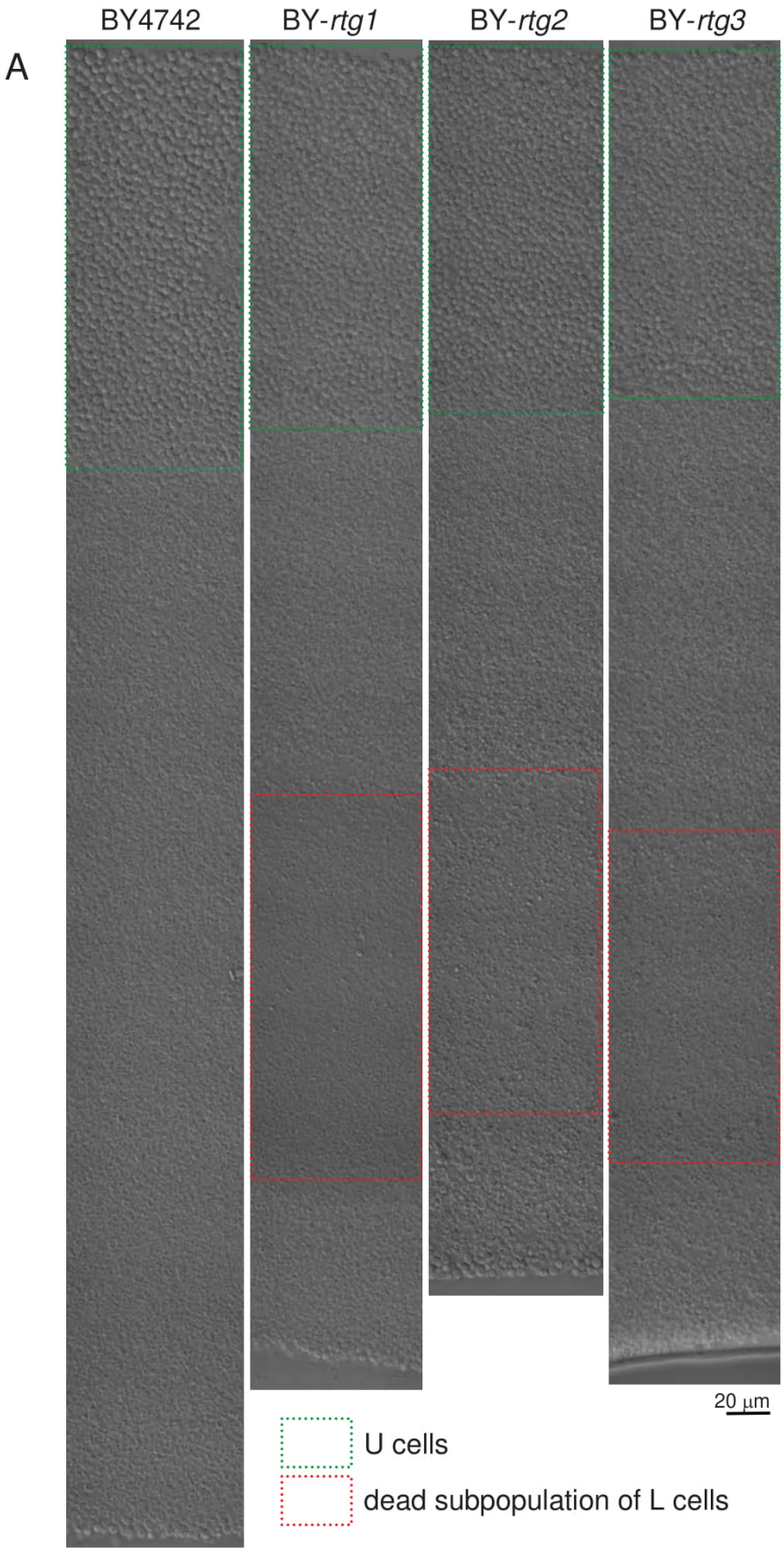
This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (15-08225S); Charles University in Prague (UNCE 204013); RVO 61388971; GAUK 686512; the project 'BIOCEV - Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University' (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) from the European Regional Development Fund; the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic; and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic project CZ.1.07/2.3.00/30.0003.

REFERENCES

1. Jazwinski SM. The Retrograde Response: A Conserved Compensatory Reaction to Damage from Within and from Without. Prog Mol Biol Transl. 2014; 127:133-154.
2. Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, Klein-Szanto A, Vijayasarathy C and Avadhani NG. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. Embo J. 2001; 20:1910-1920.
3. Miceli MV, Jiang JC, Tiwari A, Rodriguez-Quinones JF and Jazwinski SM. Loss of mitochondrial membrane potential triggers the retrograde response extending yeast replicative lifespan. Front Genet. 2011; 2:102.
4. Wallace DC. Mitochondria and cancer. Nat Rev Cancer. 2012; 12:685-698.
5. Guha M and Avadhani NG. Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics. Mitochondrion. 2013; 13:577-591.
6. Biswas G, Tang W, Sondheimer N, Guha M, Bansal S and Avadhani NG. A distinctive physiological role for I kappa B beta in the propagation of mitochondrial respiratory stress signaling. J Biol Chem. 2008; 283:12586-12594.
7. Sekito T, Thornton J and Butow RA. Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. Mol Biol Cell. 2000; 11:2103-2115.
8. Ferreira JR, Spirek M, Liu ZC and Butow RA. Interaction between Rtg2p and Mks1p in the regulation of the RTG pathway of Saccharomyces cerevisiae. Gene. 2005; 354:2-8.
9. Liu ZC, Sekito T, Spirek M, Thornton J and Butow RA. Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. Mol Cell. 2003; 12:401-411.
10. Dilova I, Aronova S, Chen JCY and Powers T. Tor signaling and nutrient-based signals converge on Mks1p phosphorylation to regulate expression of Rtg1p center dot Rtg3p-dependent target genes. J Biol Chem 2004; 279:46527-46535.
11. Dilova I, Chen CY and Powers T. Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in S. cerevisiae. Curr Biol. 2002; 12:389-395.
12. Liu ZC and Butow RA. Mitochondrial retrograde signaling. Annu Rev Genet. 2006; 40:159-185.
13. Butow RA and Avadhani NG. Mitochondrial signaling: The retrograde response. Mol Cell. 2004; 14:1-15.
14. Hallstrom TC and Moye-Rowley WS. Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic drug resistance pathway in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2000; 275:37347-37356.
15. Srinivasan V, Kriete A, Sacan A and Jazwinski SM. Comparing the yeast retrograde response and NF-kappa B stress responses: implications for aging. Aging Cell. 2010; 9:933-941.
16. Jazwinski SM. The retrograde response: When mitochondrial quality control is not enough. BBA-Mol Cell Res. 2013; 1833:400-409.
17. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S and Thompson CB. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. Proc Nat Acad Sci. 2007; 104:19345-19350.
18. Chelstowska A and Butow RA. Rtg genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins. J Biol Chem. 1995; 270:18141-18146.
19. Palkova Z, Wilkinson D and Vachova L. Aging and differentiation in yeast populations: elders with different properties and functions. FEMS Yeast Res. 2014; 14:96-108.
20. Palkova Z, Devaux F, Ricicova M, Minarikova L, Le Crom S and Jacq C. Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. Mol Biol Cell. 2002; 13:3901-3914.
21. Palkova Z, Janderova B, Gabriel J, Zikanova B, Pospisek M and Forstova J. Ammonia mediates communication between yeast colonies. Nature. 1997; 390:532-536.
22. Vachova L, Hatakova L, Cap M, Pokorna M and Palkova Z. Rapidly developing yeast microcolonies differentiate in a similar way to aging giant colonies. Oxid Med Cell Longev.

2013; 2013:102485.

23. Vachova L, Devaux F, Kucerova H, Ricicova M, Jacq C and Palkova Z. Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of Saccharomyces cerevisiae colonies. J Biol Chem. 2004; 279:37973-37981.
24. Vachova L and Palkova Z. Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. J Cell Biol. 2005; 169:711-717.
25. Cap M, Stepanek L, Harant K, Vachova L and Palkova Z. Cell differentiation within a yeast colony: Metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. Mol Cell. 2012; 46:436-448.
26. Vachova L, Cap M and Palkova Z. Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. Oxid Med Cell Longev. 2012; 2012:601836.
27. DeBerardinis RJ and Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. Oncogene. 2010; 29:313-324.
28. Bruckmann A, Hensbergen PJ, Balog CIA, Deelder AM, Steensma HY and van Heusden GPH. Post-transcriptional Control of the Saccharomyces cerevisiae proteome by 14-3-3 proteins. J Proteome Res. 2007; 6:1689-1699.
29. Vanheusden GPH, Griffiths DJF, Ford JC, Chinawoeng TFC, Schrader PAT, Carr AM and Steensma HY. The 14-3-3-proteins encoded by the Bmh1 and Bmh2 genes are essential in the yeast Saccharomyces cerevisiae and can be replaced by a plant homolog. Eur J Biochem. 1995; 229:45-53.
30. Vachova L, Chernyavskiy O, Strachotova D, Bianchini P, Burdikova Z, Fercikova I, Kubinova L and Palkova Z. Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. Environ Microbiol. 2009; 11:1866-1877.
31. Ricicova M, Kucerova H, Vachova L and Palkova Z. Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. BBA-Biomembranes. 2007; 1768:1170-1178.
32. Vachova L, Kucerova H, Devaux F, Ulehlova M and Palkova Z. Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. Environ Microbiol. 2009; 11(2):494-504.
33. Guaragnella N and Butow RA. ATO3 encoding a putative outward ammonium transporter is an RTG-independent retrograde responsive gene regulated by GCN4 and the Ssy1-Ptr3-Ssy5 amino acid sensor system. J Biol Chem. 2003; 278:45882-45887.
34. Eng CH, Yu K, Lucas J, White E and Abraham RT. Ammonia derived from glutaminolysis is a diffusible regulator of autophagy. Sci Signal. 2010; 3(119).
35. Liao X and Butow RA. RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. Cell. 1993; 72:61-71.
36. Cap M, Vachova L and Palkova Z. Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. J Biol Chem. 2009; 284:32572-32581.
37. Khamoui AV and Kim JS. Candidate mechanisms underlying effects of contractile activity on muscle morphology and energetics in cancer cachexia. Eur J Cancer Care. 2012; 21:143-157.
38. Kirchman PA, Kim S, Lai CY and Jazwinski SM. Interorganelle signaling is a determinant of longevity in Saccharomyces cerevisiae. Genetics. 1999; 152:179-190.
39. Boland ML, Chourasia AH and Macleod KF. Mitochondrial dysfunction in cancer. Front Oncol. 2013; 3:292.
40. Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D and Hegemann JH. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. Nucl Acids Res. 2002; 30:e23.
41. Sheff MA and Thorn KS. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in Saccharomyces cerevisiae. Yeast. 2004; 21:661-670.
42. Gietz RD and Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods Enzymol. 2002; 350:87-96.


A
BY4742
BY-rtg1
BY-rtg2
BY-rtg3
20 µm
U cells
dead subpopulation of L cells

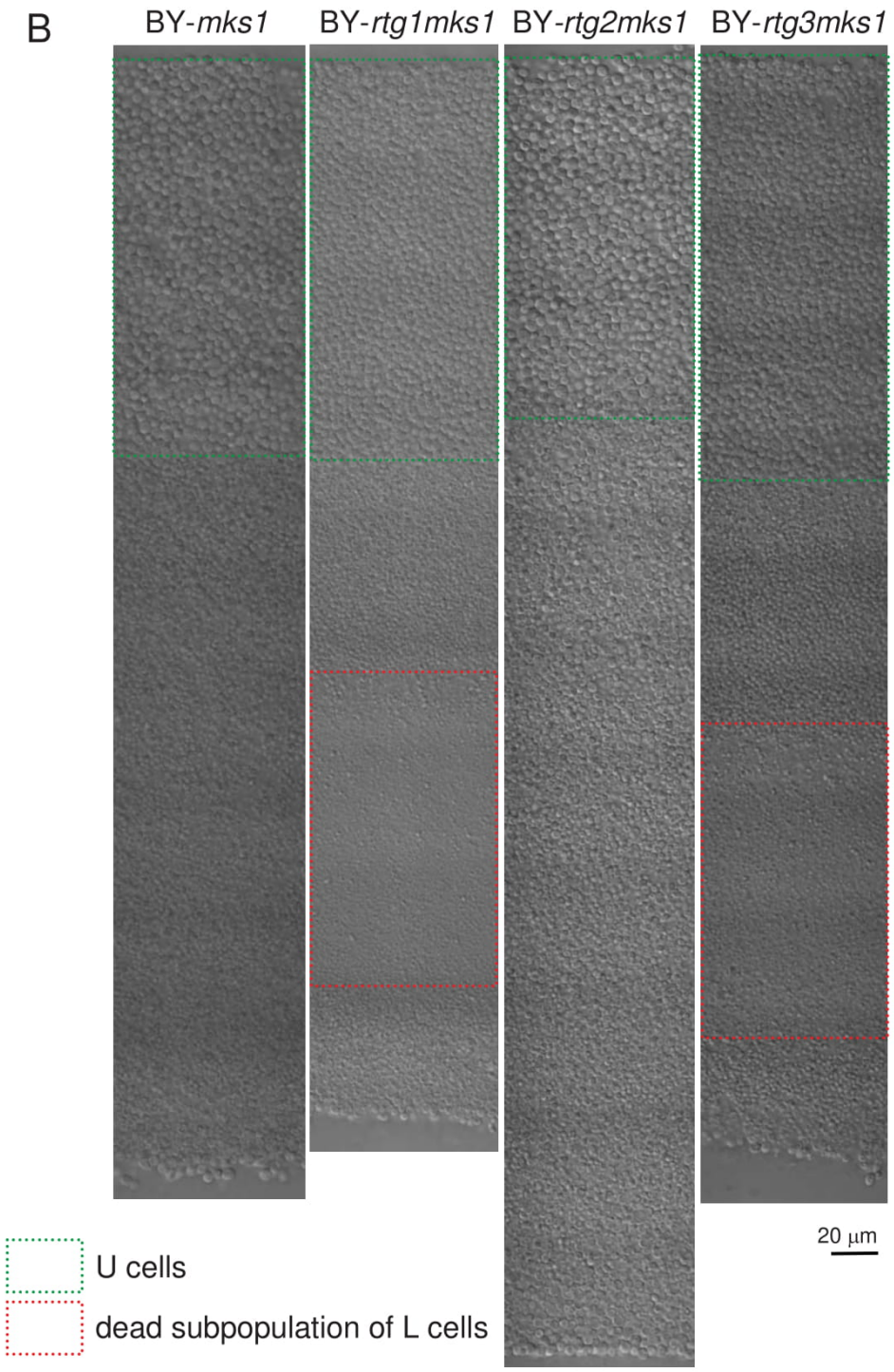


Figure S1
Vertical transversal cross-sections of 17-day-old colonies formed by wt and KO strains. (A, B) Cross-sections (20 μm thin) of colonies formed by wt and different *rtg*Δ strains were prepared by vibrating microtome and visualized by Nomarski contrast. The green dotted rectangle delimitates U cells, and the red dotted rectangle delimitates lower L cells with decreased viability in colonies of *rtg*Δ strains.

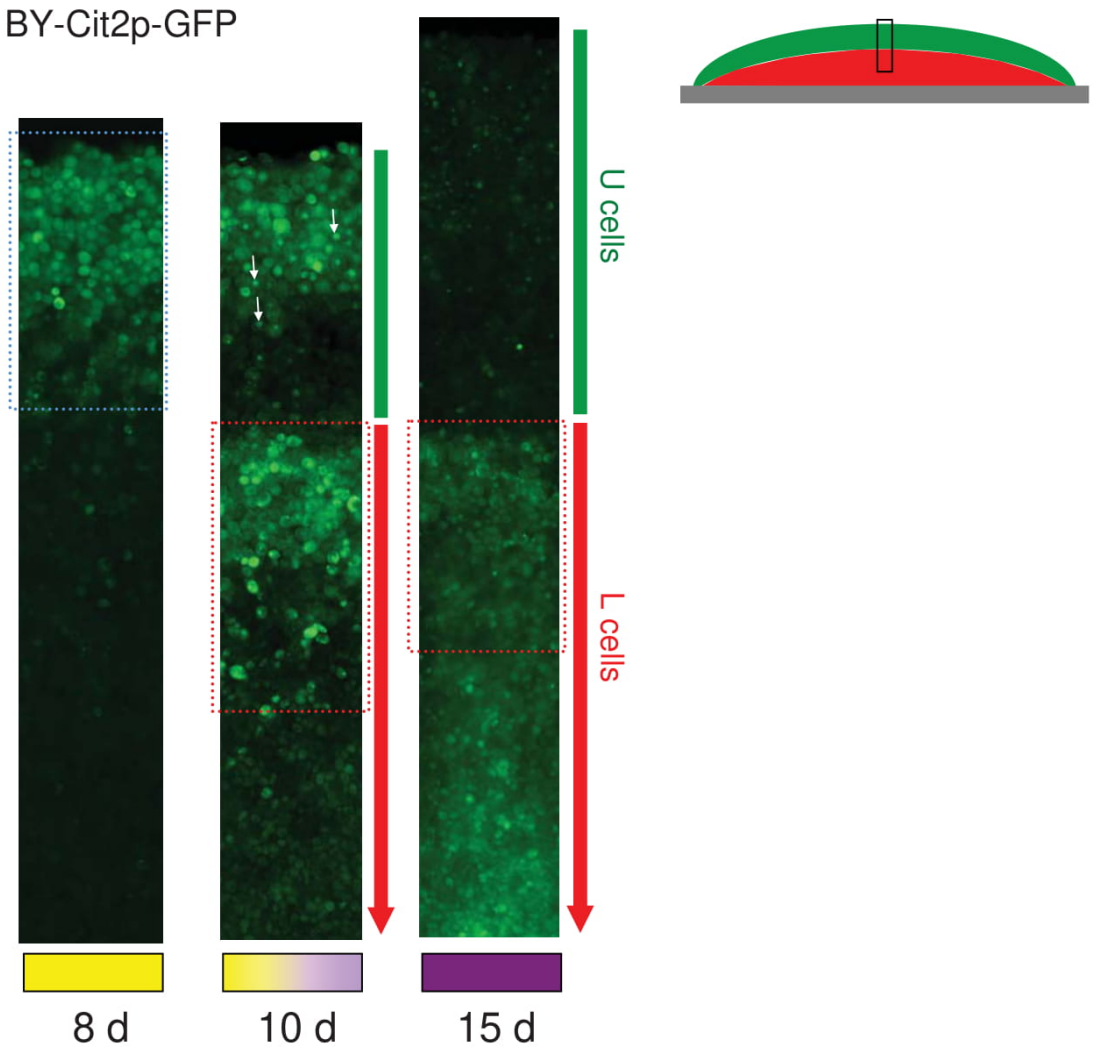
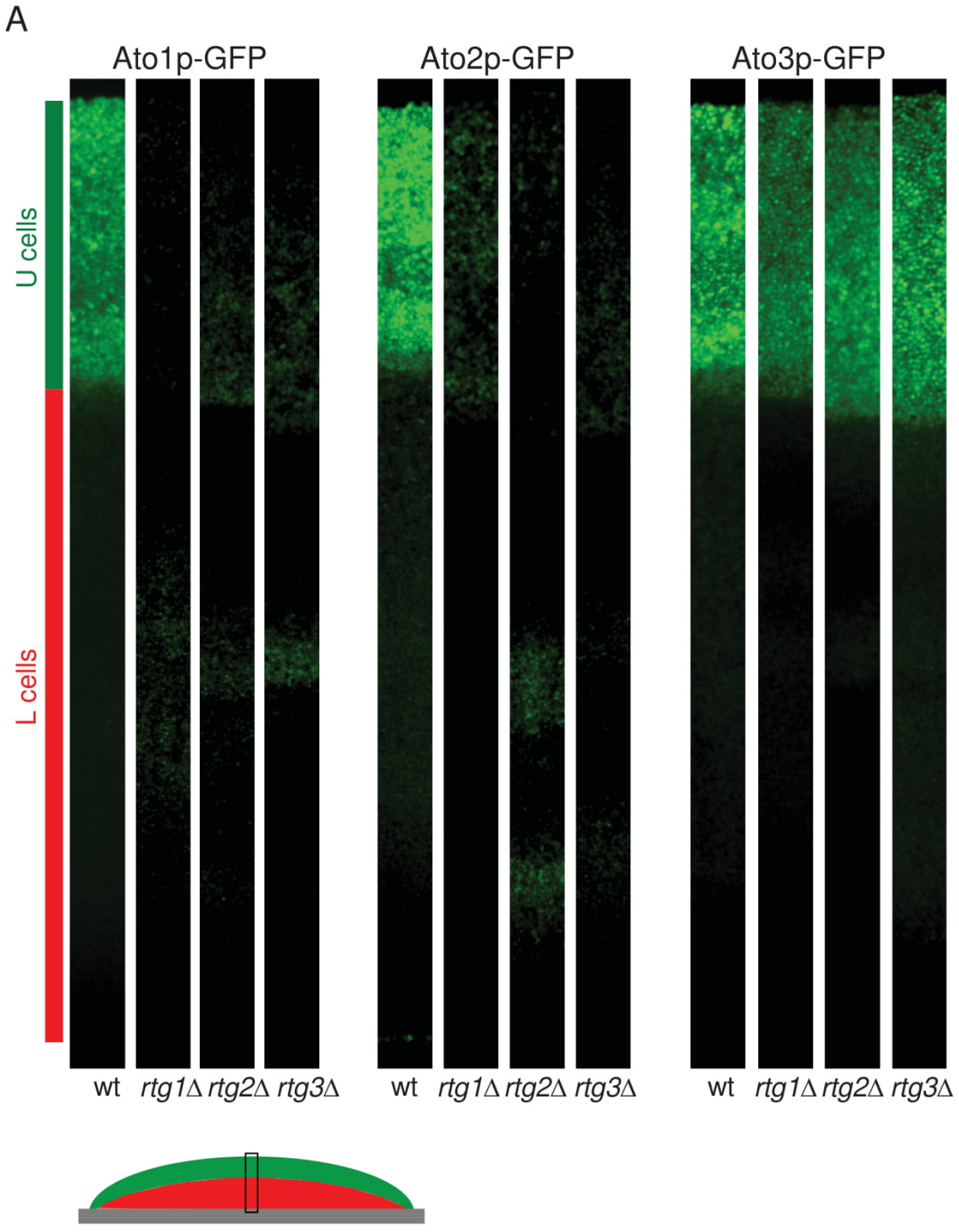


Figure S2
Vertical transversal cross-sections of giant colonies occurring in different developmental phases formed by BY-Cit2p-GFP strain. Cross-sections (20 μm thin) of colonies were prepared by vibrating microtome, and Cit2p-GFP fluorescence was detected by wide-field fluorescence microscopy. Sections of colonies occurring in late acidic phase (8-day-old, yellow bar), in the phase of transition from acidic-to-alkali phase (10-day-old, yellow-violet bar) and in the fully developed alkali phase (15-day-old, violet bar) are shown. The green bar indicates U cells, and the red bar indicates upper part of L cells. White arrows mark examples of cells with vacuolar GFP fluorescence, indicating Cit2p-GFP degradation by autophagy. The dotted blue rectangle delimitates upper cells of acidic phase colonies producing Cit2p-GFP. The dotted red rectangle delimitates upper L cells producing Cit2p-GFP. Fluorescence signal in lower parts of L cells is not related to Cit2p-GFP (as confirmed by WB, Figure 3) but to cellular autofluorescence with different spectral characteristics. Approximate position of the shown segment of cross-sections is depicted using a schematic view of a colony cross-section.


A
Ato1p-GFP
Ato2p-GFP
Ato3p-GFP
U cells
L cells
wt
rtg1Δ
rtg2Δ
rtg3Δ
wt
rtg1Δ
rtg2Δ
rtg3Δ
wt
rtg1Δ
rtg2Δ
rtg3Δ

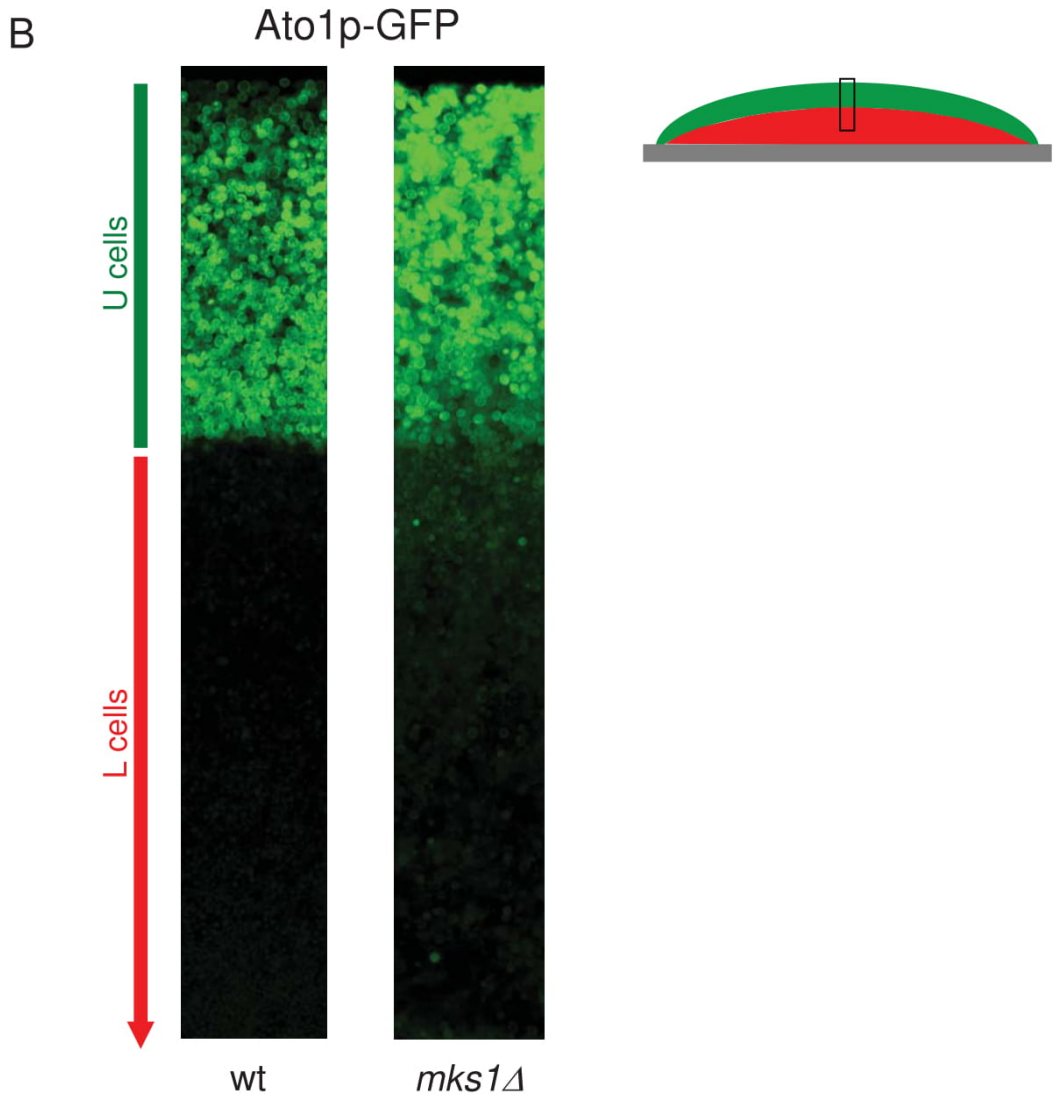


Figure S3
Vertical transversal cross-sections of 14-day-old colonies formed by wt and KO strains producing Ato-GFP proteins. Cross-sections (20 μm thin) of colonies formed by wt, *rtg*Δ and *mks1*Δ strains were prepared by vibrating microtome, and Ato-GFP fluorescence was detected by wide-field fluorescence microscopy. (A) Differences in Ato-GFP production in wt and *rtg*Δ colonies. Green and red bars indicate U and L cells, respectively. Approximate position of the shown segment of cross-sections is depicted below using a schematic view of a colony cross-section. (B) Differences in Ato1p-GFP production in wt and *mks1*Δ strains: U cells and upper part of L cells, showing that upper L cells in colonies of *mks1*Δ strain produce and properly localize Ato1p-GFP to the membrane. The same microscopy setup was used for wt and *mks1*Δ colonies. Approximate position of the shown segment of cross-sections is depicted on the right side using a schematic view of a colony cross-section.

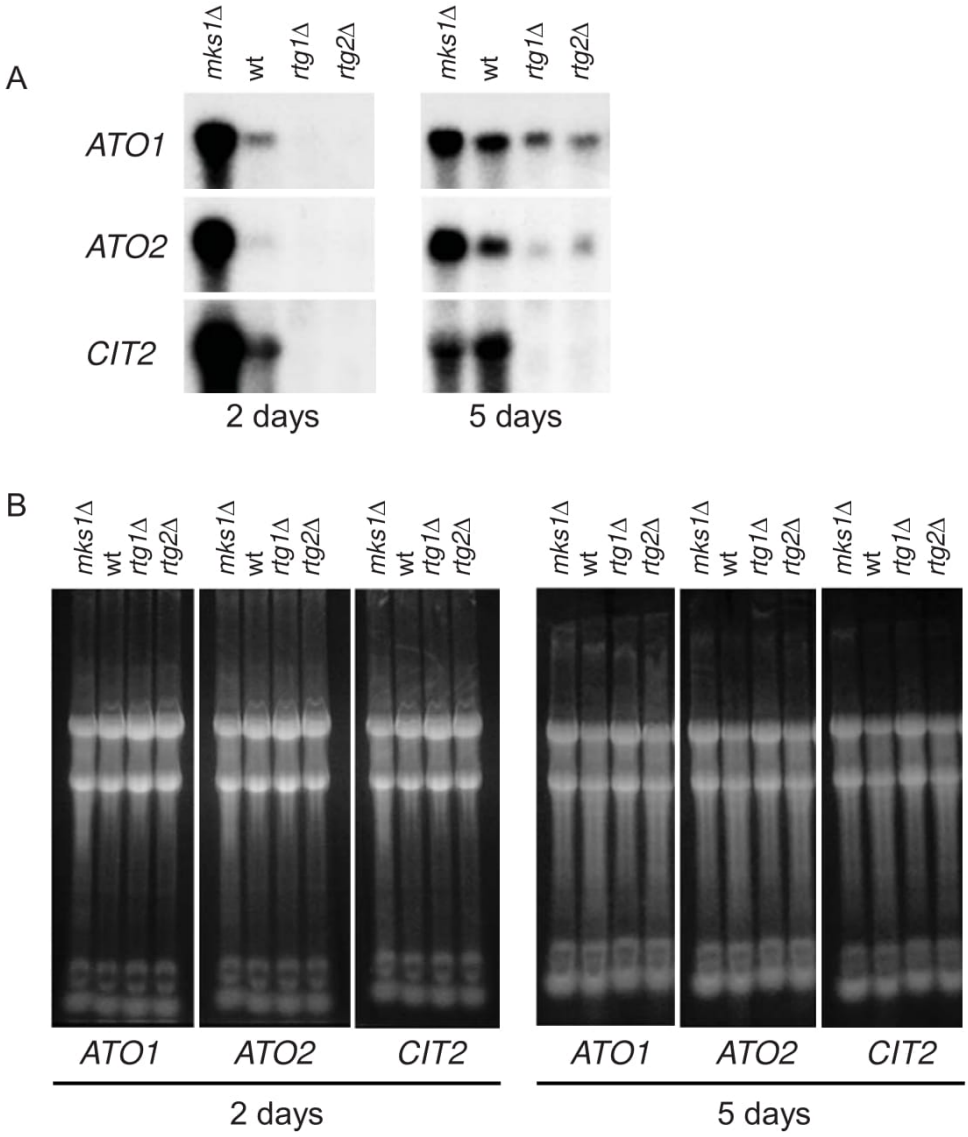
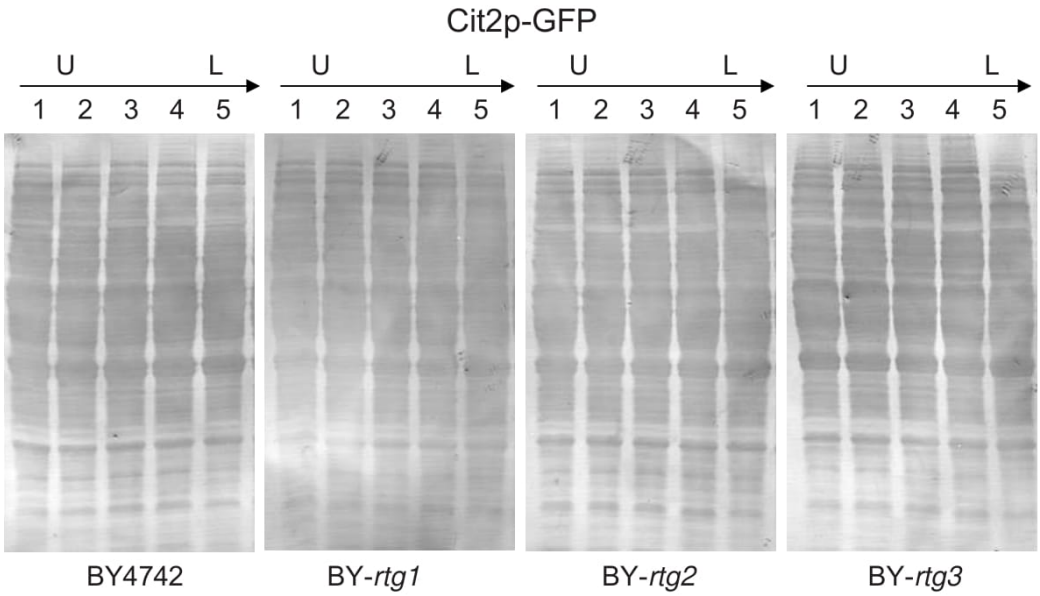
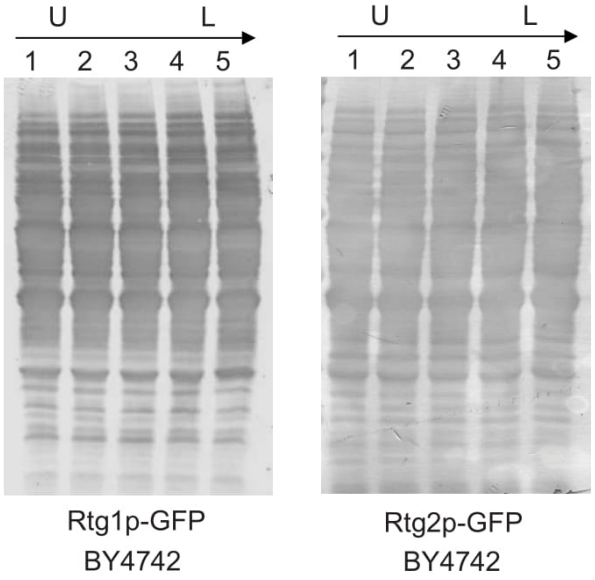


Figure S4:
***ATO1*, *ATO2* and *CIT2* mRNA levels in 2- and 5-day-old microcolonies of wt and KO strains.** A, Northern blots. B, rRNAs visualized by ethidium bromid staining (loading controls).

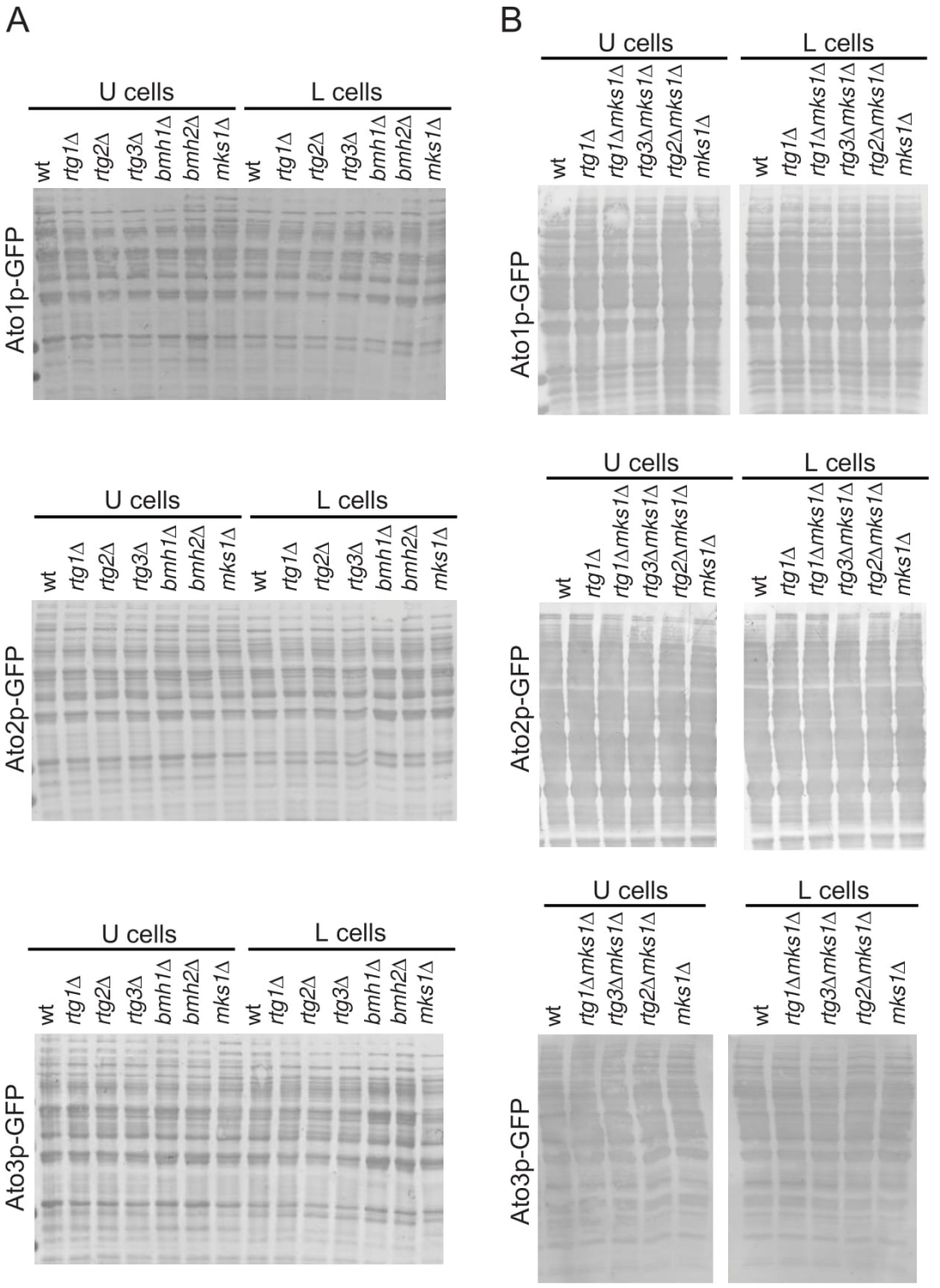
Loading controls for the Figure 3A



Loading controls for the Figure 3B



Loading controls for the Figure 4



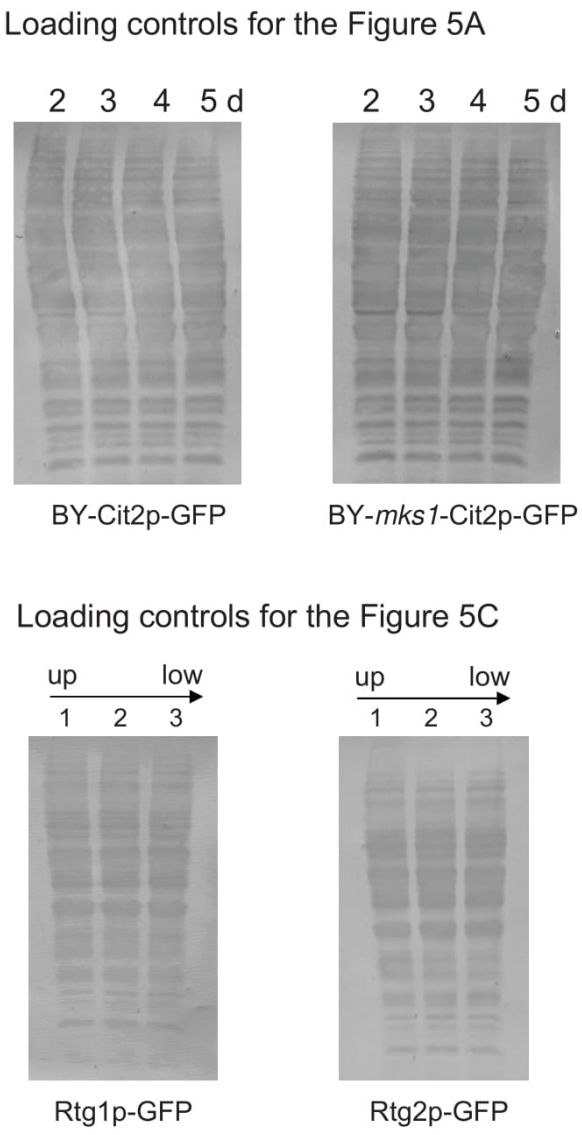


Figure S5
Loading controls for Western blots shown in Figures 3, 4 and 5.
Membranes stained by the Commassie blue dye.

5.4 Mitochondrial retrograde signaling contributes to metabolic differentiation in yeast colonies

Plocek V., Fadrhonc K., Maršíková J., Váchová L., Pokorná A., Hlaváček O., Wilkinson D., Palková Z.
Int J Mol Sci. 2021 May 25;22(11):5597. doi: 10.3390/ijms22115597.

IF_{2019} = 4.556

Tato práce navazuje na předešlou naši publikaci zaměřenou na RTG dráhu, ve které jsme identifikovali tři divergentní větve RTG regulace, jež specificky regulují specifické markery v různých buněčných populacích diferencované kvasinkové kolonie *S. cerevisiae*.

V této práci jsme se pokusili identifikovat nové cílové proteiny a procesy regulované pomocí RTG dráhy. Analýzou proteomu jednotlivých buněčných subpopulací kolonií v acidické a alkalické fázi růstu rodičovského kmene a kmenů s delecemi v regulátorech RTG dráhy jsme identifikovali tři velké skupiny genů. První skupina je regulována klasickou cestou, kde RTG1 aktivuje RTG odpověď a MKS funguje jako negativní regulátor této dráhy. Druhá skupina genů je také aktivována pomocí RTG1, avšak MKS1 nemá na jejich expresi vliv. Třetí skupinou jsou geny, které jsou negativně regulovány pomocí RTG1.

Dále jsme též ukázali, že většina genů, které jsou pozitivně regulovány pomocí RTG dráhy, má specifickou expresi v U buňkách alkalické kolonie, že k regulaci dochází za přítomnosti aktivního TORC1 a dotyčné geny mají expresní profil dříve popsané Ato-větve regulace RTG. Naproti tomu proteinů, které jsou regulovány klasickou RTG regulací za neaktivního TORC1, je velmi málo, kromě typického markerového proteinu Cit2p jsou to ještě Dld3p a Ree1p.

Zjistili jsme, že hlavním cílem RTG regulace jsou v alkalické kolonii U buňky, kdy u nich dochází k aktivaci metabolických procesů vedoucích přes TCA cyklus k syntéze aminokyselin a zároveň se u těchto buněk projevuje potlačení exprese genů podílejících se na mitochondriální translaci.

Proteomická data jsme doplnili mikroskopickými analýzami spojenými s kvantifikací vybraných cílových proteinů RTG dráhy pomocí northern a western blot analýz.

Můj podíl na publikaci: Pro publikaci jsem připravil část z kmenů použitých pro verifikaci výsledků proteomické analýzy (Tab. 1) a provedl velkou část mikroskopických analýz lokalizace GFP variant proteinů kontrolovaných RTG dráhou v mikrokoloniích (vertikální řezy, mikroskopie, zpracování dat) v různých růstových fázích (Obr. 2 – část, Obr. 4). Rovněž jsem připravoval vzorky pro western blot analýzy mikrokolonií (Obr. 3A). Participoval jsem na sepisování publikace.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Mitochondrial Retrograde Signaling Contributes to Metabolic Differentiation in Yeast Colonies

Vítězslav Plocek [1,†], Kristýna Fadrhonc [1,†], Jana Maršíková [1], Libuše Váchová [2], Alexandra Pokorná [2], Otakar Hlaváček [2], Derek Wilkinson [1] and Zdena Palková [1,*]

[1] Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University, BIOCEV, 12800 Prague, Czech Republic; v.plocek@email.cz (V.P.); krispodholova@gmail.com (K.F.); jana.rusinova@natur.cuni.cz (J.M.); derek.wilkinson@natur.cuni.cz (D.W.)
[2] Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, BIOCEV, 14220 Prague, Czech Republic; vachova@biomed.cas.cz (L.V.); pokorna@biomed.cas.cz (A.P.); hlavacek@biomed.cas.cz (O.H.)
* Correspondence: zdenap@natur.cuni.cz
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: During development of yeast colonies, various cell subpopulations form, which differ in their properties and specifically localize within the structure. Three branches of mitochondrial retrograde (RTG) signaling play a role in colony development and differentiation, each of them activating the production of specific markers in different cell types. Here, aiming to identify proteins and processes controlled by the RTG pathway, we analyzed proteomes of individual cell subpopulations from colonies of strains, mutated in genes of the RTG pathway. Resulting data, along with microscopic analyses revealed that the RTG pathway predominantly regulates processes in U cells, long-lived cells with unique properties, which are localized in upper colony regions. Rtg proteins therein activate processes leading to amino acid biosynthesis, including transport of metabolic intermediates between compartments, but also repress expression of mitochondrial ribosome components, thus possibly contributing to reduced mitochondrial translation in U cells. The results reveal the RTG pathway's role in activating metabolic processes, important in U cell adaptation to altered nutritional conditions. They also point to the important role of Rtg regulators in repressing mitochondrial activity in U cells.

Keywords: mitochondrial retrograde signaling; yeast colonies; colony development and differentiation; *Saccharomyces cerevisiae*; proteomic analysis

check for updates

Citation: Plocek, V.; Fadrhonc, K.; Maršíková, J.; Váchová, L.; Pokorná, A.; Hlaváček, O.; Wilkinson, D.; Palková, Z. Mitochondrial Retrograde Signaling Contributes to Metabolic Differentiation in Yeast Colonies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5597. https://doi.org/10.3390/ijms22115597

Academic Editors: Sergio Giannattasio, Paolo Pinton and Maša Ždralević

Received: 4 May 2021
Accepted: 21 May 2021
Published: 25 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Mitochondria in eukaryotic cells provide key metabolic processes, energy production, cellular redox state, and a number of signaling processes affecting overall cell physiology. Disorders in various mitochondrial metabolic and signaling processes often lead to severe disorders in mammals [1]. Changes in mitochondria, whether caused by mitochondrial damage or changes in the conditions to which the cell is exposed, can activate cellular responses by a mechanism called "mitochondrial retrograde signaling", where changes in mitochondria cause extensive changes in nuclear gene expression to help the cell adapt to the new conditions [2]. Molecular mechanisms of retrograde signaling in mammals are poorly understood, but such signaling is often associated with changes, typical of cancer disorders, including activation of enzymes involved in aerobic glycolysis [1]. The most studied system of retrograde signaling (the RTG pathway) in yeast *Saccharomyces cerevisiae* includes activators—a heterodimeric transcription factor composed of the Rtg1p and Rtg3p proteins and the Rtg2p protein, which registers mitochondrial signal(s) by an unknown mechanism [3]. In addition to RTG pathway activators, several repressors of this pathway have been identified, including the key repressor Mks1p, with which Rtg2p competes (Figure 1A) [4,5]. Negative regulation of the RTG pathway by the TORC1 protein kinase complex has also been described [3,6,7]. The *CIT2* gene encoding the peroxisomal isoform

of citrate synthase hasf been identified as a typical target of the RTG pathway, and is often used as a marker of RTG pathway activation. Activation of peroxisomal functions and anaplerotic reactions, including the glyoxylate cycle, seem to be the major cellular response elicited by RTG signaling in individual liquid culture-grown cells and their mutants with mitochondrial disorders (petite strains) [8–10].

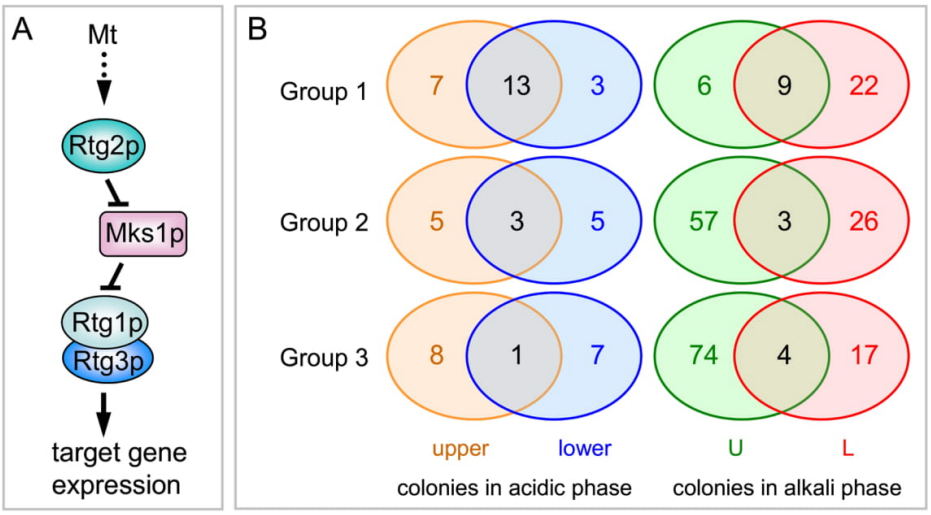


Figure 1. Simple scheme of standard RTG pathway regulation (**A**) and overview of genes in three groups, regulated in different ways in yeast colonies by the RTG-pathway (**B**). (**A**) The diagram shows the positions of Rtg activators and the Mks1p repressor in the standard pathway. Mt, mitochondria. (**B**) Numbers indicate genes induced by Rtg1p and repressed by Mks1p (Group 1); genes induced only by Rtg1p (Group 2) and genes repressed by Rtg1p (Group 3). Orange, upper cells; blue, lower cells (acidic-phase colonies). Green, U cells; red, L cells (alkali-phase colonies).

Unlike yeast cells in liquid media, which behave as individuals, cells within multicellular populations (colonies, biofilms) acquire various properties, typical of multicellular organisms, including the ability to differentiate and form specialized cell subpopulations that are specifically localized within the multicellular structure [11,12]. Recently, we found that RTG signaling is important for the development and differentiation of yeast colonies, and we identified three branches of RTG signaling, which all require RTG activators and the Mks1p repressor, but activate different targets [13]. Colonies grown on a complex respiratory medium pass through several developmental stages, during which they change the pH of their surroundings from acidic to alkali and vice versa. In the alkali phase, colonies produce volatile ammonia (which acts as a signaling molecule) and colony cells differentiate into two main distinct cell subpopulations—U cells in the upper and L cells in the lower colony regions [14–17]. These two cell subpopulations differ in their metabolism and regulation [14,17,18]. RTG signaling regulates expression of different marker genes in U cells and L cells, and further diversification of cellular response to this signaling has been described in upper and lower L cells. The *CIT2* gene is a typical target, regulated by the RTG pathway in upper L cells. This gene is not activated in U cells, where other RTG targets—*ATO2* and *ADY2* (*ATO1*) genes associated with ammonia signaling, were identified. Neither is it activated in lower L cells, where the RTG pathway is essential for the survival of these cells [12,13]. Typical U and L cell differentiation and RTG regulation are similar in microcolonies (colonies arising from a single cell) and in giant colonies formed from a drop of cell suspension [13,17].

In this work, we analyzed proteomes of cell subpopulations separated from colonies of strains, harboring different mutations in genes for RTG-signaling components, during two distinct stages of their development. Proteomic data, supplemented by microscopic

analyses along with detailed quantification of selected proteins and mRNA, allowed us to gain a comprehensive view of the processes, regulated by the RTG pathway in cell subpopulations of colonies at various stages of their development.

2. Results

2.1. Genome-Wide Proteomic Analysis of Colony Cell Subpopulations

Giant colonies of strain BY4742 (wt) and knockout (KO) strains BY-*rtg1*, BY-*mks1*, BY-*rtg1mks1* and BY-*rtg2mks1* (Table 1) were cultivated on GMA plates until they reached the acidic (5-day-old) or alkali (15-day-old) developmental phase. Then, two cell subpopulations were harvested, upper and lower cells from the acidic-phase colonies and U and L cells from alkali-phase colonies. Lysates were prepared from each cell sample and proteomes were analyzed using a label-free LC-MS/MS method.

Table 1. Strains.

Strain	Genotype	Source
BY4742	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0	Euroscarf
BY-*rtg1*	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX	[13]
BY-*mks1*	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX	[13]
BY-*rtg1mks1*	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::hph, *mks1*::NatMX	[13]
BY-*rtg2mks1*	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg2*::hph, *mks1*::NatMX	[13]
BY-Arg1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *ARG1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Arg1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *ARG1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Arg1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *ARG1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Cat2p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *CAT2*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Cat2p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *CAT2*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Cat2p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *CAT2*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Cit3p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *CIT3*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Cit3p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *CIT3*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Cit3p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *CIT3*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Crc1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *CRC1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Crc1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *CRC1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Crc1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *CRC1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Dld3p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *DLD3*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Dld3p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *DLD3*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Dld3p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *DLD3*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Gdh3p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *GDH3*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Gdh3p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *GDH3*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Gdh3p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *GDH3*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Leu1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *LEU1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Leu1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *LEU1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Leu1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *LEU1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Oac1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *OAC1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Oac1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *OAC1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Oac1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *OAC1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Pdh1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *PDH1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Pdh1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *PDH1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Pdh1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *PDH1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Tah1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *TAH1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Tah1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *TAH1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Tah1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *TAH1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Yat1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *YAT1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Yat1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *YAT1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Yat1p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *YAT1*-yEGFP-KanMX	this study
BY-Yat2p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *YAT2*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*rtg1*-Yat2p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *rtg1*::NatMX, *YAT2*-yEGFP-KanMX	this study
BY-*mks1*-Yat2p-GFP	MATα, *his3*Δ1, *leu2*Δ0, *lys2*Δ0, *ura3*Δ0, *mks1*::NatMX, *YAT2*-yEGFP-KanMX	this study

In the RTG pathway (Figure 1A), Rtg2p functions upstream of Mks1p, and thus the combined *rtg2mks1* deletion should affect RTG signaling similarly to the *mks1* deletion itself. In contrast, Rtg1p functions downstream of Mks1p in the pathway, and thus the combined *rtg1mks1* deletion should affect RTG signaling similarly to the *rtg1* deletion itself. Therefore, we analyzed proteomics datasets to identify proteins, significantly enriched or reduced in both the wt versus BY-*rtg1* and wt versus BY-*rtg1mks1* subpopulations, as well as those, enriched or reduced in the wt versus BY-*mks1* and wt versus BY-*rtg2mks1* subpopulations. The identification of enriched/reduced proteins in such a pairwise analysis of strains with similar behavior strongly reduces non-specific background (especially in the case of less abundant proteins) and eliminates differences, unrelated to RTG signaling. In addition, we compared the abundance of proteins in the upper/U and lower/L cells of wt colonies to select groups of proteins, more abundant in upper/U or lower/L cells, respectively. Further grouping of proteins selected in the pairwise analysis led to identification of three main protein groups with different patterns of regulation by Rtg regulators (Figure 1B). To validate proteomic data, we constructed wt strains producing GFP-tagged versions of selected identified proteins and subsequently KO strains with either the *RTG1* or *MKS1* gene deleted. The level of GFP-tagged proteins in colonies was monitored in situ by fluorescence microscopy and in cells separated from colonies by Western blot (Figures 2–4).

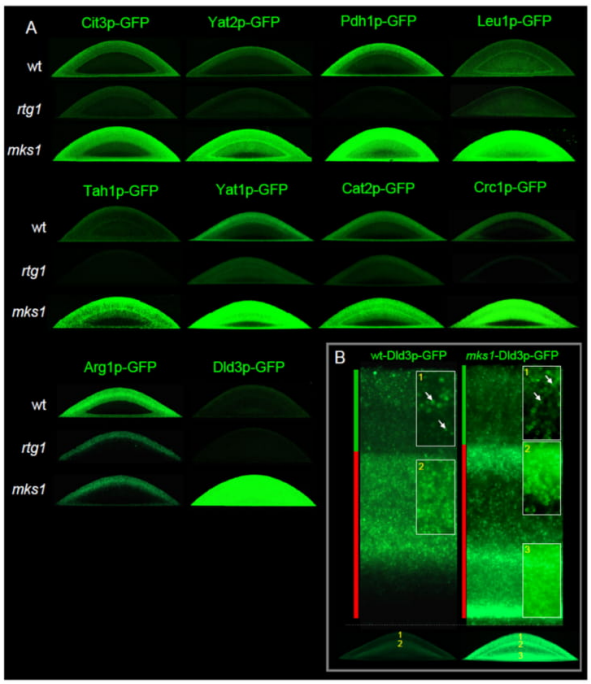


Figure 2. Levels of selected Group 1 proteins fused with GFP within alkali-phase differentiated colonies of wt and KO strains. (**A**) Localization of the indicated protein is visualized as green fluorescence on vertical colony cross sections of 4-day-old microcolonies in the alkali phase. The same microscopy setup was used for all colonies of wt, *rtg1* and *mks1* strains producing the indicated fusion proteins. Thus, fluorescence intensity roughly reflects differences in the level of the particular protein in colonies of the three strains. (**B**) Cross-sections of central regions of BY-Dld3p-GFP and BY-*mks1*-Dld3p-GFP microcolonies in later alkali phase showing cellular localization of Dld3p-GFP in higher magnification. Arrows indicate localization of free GFP (a degradation product of Dld3p-GFP) in vacuoles. Different exposure times were employed during microscopy of the two strains to show details of Dld3p-GFP localization in spite of strong differences in Dld3p-GFP levels in their colonies as shown in (**A**).

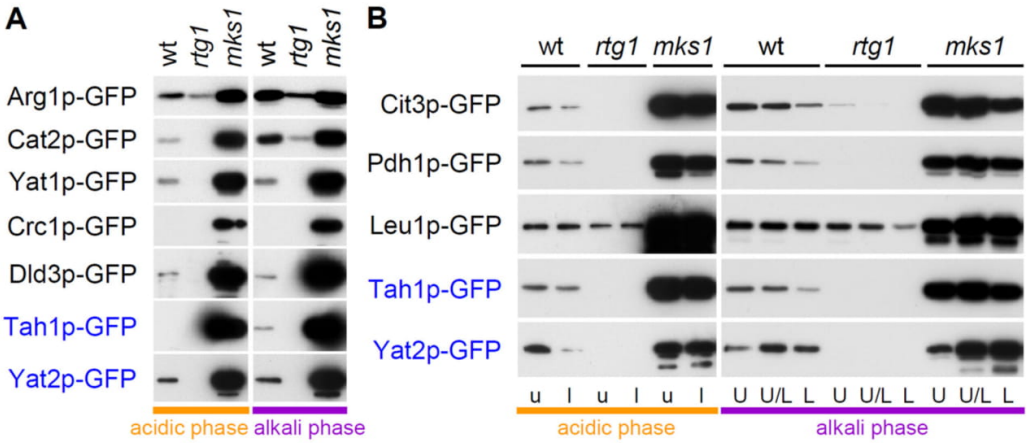


Figure 3. Comparison of amounts of selected Group 1 proteins in colonies of wt and KO strains. (**A**) Levels of selected Group 1—GFP proteins in 2-day-old acidic- and 4-day-old alkali-phase microcolonies formed by wt and KO strains. (**B**) Levels of selected Group 1—GFP proteins in upper (u) and lower (l) cells from 5 day-old acidic-phase giant colonies and in U, U/L (cells close to the border between U and L cells) and L cells from 15-day-old giant colonies formed by wt and KO strains were determined by Western blot. In blue, protein levels were analyzed in both microcolonies and giant colonies. Loading controls are in Figures S1 and S2.

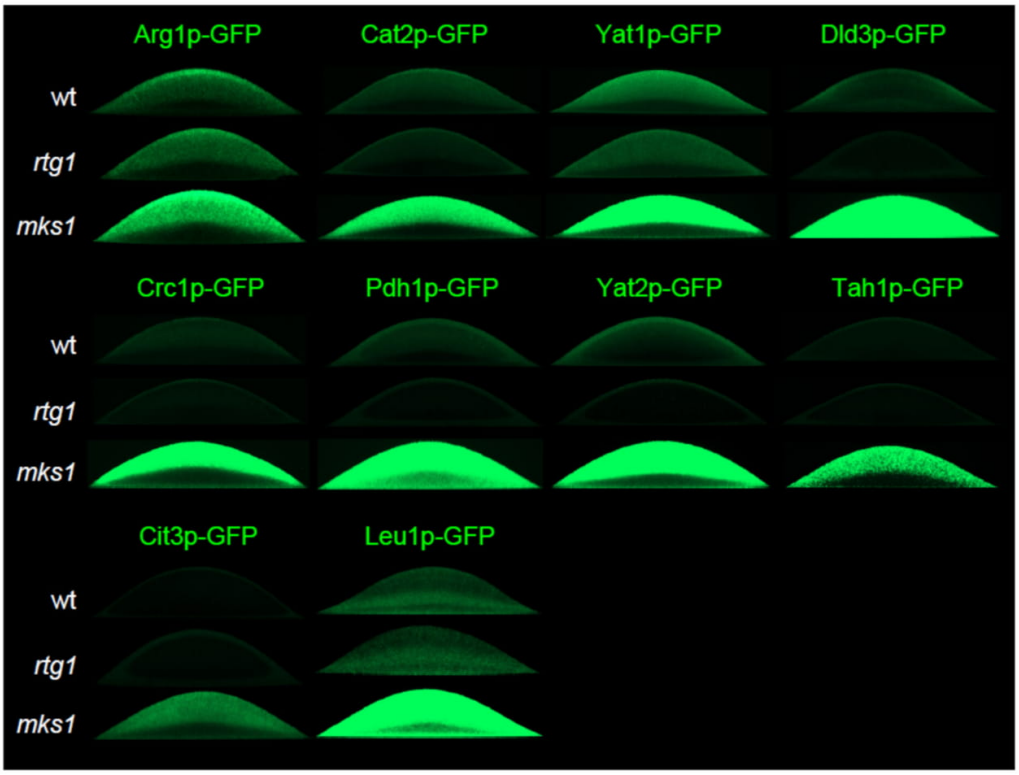


Figure 4. Levels of selected Group 1 proteins fused with GFP within acidic-phase colonies of wt and KO strains. Localization of the indicated protein is visualized as green fluorescence on vertical colony cross sections of 2-day-old microcolonies. The same microscopy setup was used for all colonies (wt, *rtg1* and *mks1*) producing the indicated protein. Thus, fluorescence intensity roughly reflects differences in the level of the particular protein in colonies of the three strains.

2.2. Group 1 Proteins Are Regulated by the RTG Pathway in a Standard Way

Group 1 includes proteins, whose abundance was significantly higher in cell subpopulations of wt versus both BY-*rtg1* and BY-*rtg1mks1* and, concurrently, lower in wt versus BY-*mks1* and BY-*rtg2mks1*. Expression of these proteins should thus be conventionally regulated by the RTG pathway, with Rtg1p as a positive regulator and Mks1p as a repressor. In alkali-phase colonies, 15 proteins belonging to this group were identified in U cell-samples and 31 in L cell-samples (Figure 1B, Table S1A). From these, nine proteins (Crc1p, Oac1p, Ato2p, Yat1p, Cit3p, Yat2p, Pdh1p, Leu4p and Leu1p) were identified in both the U and L cell datasets, with Ato2p and Cit3p significantly more abundant in U cells, compared with L cells of wt colonies (columns U and V). The other seven proteins were similarly expressed by both U and L cells of wt colonies. Of six proteins, specifically identified in the U cell dataset (Adh4p, Tah1p, Err3p, Fdh1p/Fdh2p, Cat2p and Icl2p), five were more abundant in U than L cells of wt colonies. The level of all 6 proteins was markedly enhanced in L cells by *MKS1* gene deletion. Similarly, deletion of *MKS1* increased the levels of nine proteins that are regulated by the RTG pathway in both U and L cells, more-so in L cells than in U cells. Of 22 proteins of Group 1 with typical RTG regulation only in L cells, 3 proteins (Cit2p, Dld3p, Ree1p) exhibit significantly higher expression in L than U cells of wt colonies. Of these proteins only Dld3p was strongly repressed by Mks1p in U cells; Mks1p repression of the others was mild. The other 14 proteins exhibited higher expression in U than L cells and 5 were equally expressed. None of these 19 proteins was repressed in U cells by Mks1p, but Sry1p accumulation was strongly enhanced by the presence of Mks1p and levels of the other 5 proteins were only moderately enhanced.

Strains with selected Group 1—proteins identified in alkali-phase colonies (Cit3p, Yat2p, Pdh1p, Leu1p, Tah1p, Yat1p, Cat2p, Crc1p, Arg1p and Dld3p) labeled with GFP, as well as their *rtg1*Δ and *mks1*Δ derivatives, were further analyzed. Fluorescence and confocal microscopy of cross-sections of 4-day-old alkali-phase microcolonies (Figure 2) of these strains together with Western blots (Figure 3) confirmed typical RTG-pathway regulation of these proteins and provided additional information on their level in colony cell subpopulations. In addition to Cit3p-GFP and Cat2p-GFP identified in proteomics to be more abundant in U than in L cells of 15-day-old giant colonies, Yat2p-GFP, Pdh1p-GFP, Yat1p-GFP, Crc1p-GFP and Arg1p-GFP exhibited similar expression patterns in alkali-phase microcolonies (Figure 2A). Leu1p-GFP levels in U and L cells were similar. Tah1p and Dld3p levels in wt microcolonies were low and fluorescence levels were similar to background autofluorescence, but both proteins were detected in wt colonies by Western blot (Figure 3A). Dld3p exhibited a similar concentration profile in the proteomics analysis as Cit2p, which is present in upper cells of acidic-phase colonies but disappears from U cells after U/L cell differentiation while continuing to be present in upper L cells [13]. A detailed microscopic analysis of Dld3p-GFP cellular localization in microcolonies of the wt and *mks1*Δ strains in the later alkali phase (~5-day-old), revealed a pattern, similar to that of Cit2p-GFP in U cells and upper L cells (Figure 2B). Cit2p-GFP abundance does not increase in lower L cells of the *mks1*Δ strain. In contrast, the Dld3p-GFP level also strongly increased in lower L cells upon *MKS1* deletion. Western blots of Cit3p-GFP, Pdh1p-GFP, Leu1p-GFP, Tah1p-GFP and Yat2p-GFP cell subpopulations separated from 15-day-old alkali-phase giant colonies (Figure 3B) showed higher level of Cit3p-GFP, Pdh1p-GFP and Tah1p-GFP in U cells compared to L cells of wt colonies. Leu1p-GFP levels were similar in both cell types and Yat2p-GFP levels were higher in L than in U cells. These comparisons showed that all targets tested are regulated by the RTG pathway in both giant colonies and microcolonies with a largely similar pattern of expression in differentiated cells. An exception is Yat2p with a higher level in U cells of microcolonies but a slightly higher level in L cells in giant colonies in alkali phase.

In acidic-phase colonies (Figure 1B, Table S1B), overlap between Group 1 proteins, identified in proteomics of upper and lower cell-samples, was higher than between U and L cells of differentiated alkali-phase colonies (Table S1A). In acidic-phase upper cells 20 proteins, and in lower cells 16 proteins, belong to this group. Thirteen of these proteins

(Pdh1p, Crc1p, Gdh3p, Ady2p, Cit3p, Cit2p, Icl2p, Yat2p, Yat1p, His4p, Mae1p, Acs1p and Cat2p) were identified in both cell types and regulated with similar efficiency by both Rtg1p and Mks1p. Accordingly, only two (Cit3p, His4p) of these proteins exhibited a slightly higher level in upper than in lower cells while others were equally abundant in each. Six of seven Group 1 proteins of that were identified only in upper cells (Arg1p, Leu4p, Dld3p, Hom3p, Sps100p, Lys4p, Aco2p) and two of the three identified only in lower-cells (Ald5p, Ade17p and Nde2p), were moderately repressed in upper cells by Mks1p. Dld3p was strongly Mks1p-repressed in both upper and lower cells. Microscopy and Western blotting analysis of acidic-phase microcolonies of strains with selected targets labeled with GFP (Figures 3A and 4) confirmed RTG pathway regulation and showed relatively moderate (or even undetectable) amount of these proteins in microcolonies together with their strong induction in upper colony regions due to *MKS1* deletion.

Altogether, we identified 40 proteins belonging to Group 1, whose levels were conventionally regulated by the RTG pathway in either both acidic and alkali colonies (22 proteins) or only in acidic (3 proteins) or only in alkali (15 proteins) colonies.

2.3. Group 1 Proteins Are Regulated by the RTG Pathway at the Level of mRNA Expression

Next, we investigated whether Group 1 proteins are regulated by the RTG pathway at the transcriptional level (mRNA level). We separated cells from upper and lower parts of 5-day-old acidic-phase giant colonies of wt, BY-*rtg1* and BY-*mks1* strains and analyzed mRNA of selected genes (*CIT3*, *YAT1*, *PDH1*, *CRC1*, *DLD3*, *TAH1*, *GDH3*, *OAC1*) by Northern blot (Figure 5). In all cases, the level of mRNA was lower in the BY-*rtg1* and higher in the BY-*mks1* strain as compared to wt, thus confirming mRNA expression regulation via the RTG pathway. Levels of most of the mRNAs were not significantly different between upper and lower cells in colonies of the wt strains, whereas *MKS1* deletion often enhanced mRNA levels more in upper than in lower cells.

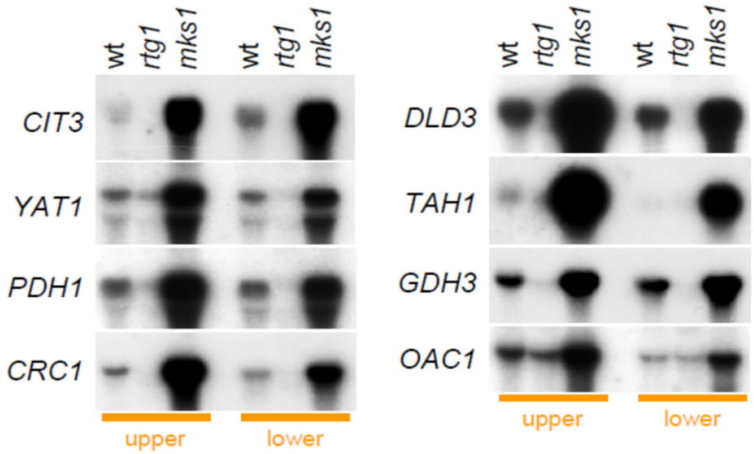


Figure 5. Comparison of levels of mRNAs encoding selected *Group 1* proteins in colonies of wt and KO strains. Amounts of mRNAs encoding particular proteins in cells of upper and lower fractions of 5-day-old giant colonies formed by wt, BY-*rtg1* and BY-*mks1* strains, detected by Northern blot. Loading controls are in Figure S3.

2.4. Two Other Groups of Proteins Are Regulated by Rtg Proteins Independently of Mks1p Repression

Group 2 includes proteins whose levels were decreased in both BY-*rtg1* and BY-*rtg1mks1* cells as compared to wt, but were not increased by *MKS1* deletion in BY-*mks1* and BY-*rtg2mks1* cells. A total of 60 and 29 proteins belonging to this group were identified in U and L cells, respectively, in alkali-phase colonies (Figure 1B, Table S2A). Of these, only three

proteins were identified in both the U and L cell datasets, whereas others were specific either to U or L cells. The expression of 20 out of 60 and 6 out of 29 of these proteins also decreased after the deletion of *MKS1* (in both BY-*mks1* and BY-*rtg2mks1* cells). U cell specific proteins belonging to Group 2 were enriched ($p < 0.01$) for Gene Ontology (GO) terms related to amino acid metabolic (mostly biosynthetic) processes, mainly enzymes involved in biosynthesis of arginine, glutamine, aspartate, lysine and sulfur amino acids (Table S2A). Most (48) of these proteins were more abundant in U than in L cells of wt colonies. The abundance of some of these proteins was not affected in BY-*mks1* and BY-*rtg2mks1* cells, some others proteins abundances were lower in these strains. L cell proteins of Group 2 were enriched ($p < 0.01$) only for GO terms related to vitamin (mainly thiamine) biosynthetic processes. The levels of all identified vitamin-related proteins also decreased upon deletion of *MKS1*. Only 13 proteins of acidic-phase colonies belong to Group 2 (Figure 1B). Eight were identified in upper and eight in lower cells, including three proteins, detected in both upper and lower cells. No significant GO term category of has been identified and most of these Group 2 proteins were also identified in alkali-phase colonies (Table S2B).

Group 3 includes proteins whose levels were increased in both BY-*rtg1* and BY-*rtg1mks1* cells as compared to the wt (Figure 1B, Table S3). A small number of these proteins also increased in concentration due to *MKS1* deletion. 78 proteins were identified in U cells of alkali-phase colonies (Table S3A), 9 of which increased in concentration due to *MKS1* deletion. Twenty-one proteins were identified in L cells, including two proteins, the level of which decreased due to *MKS1* deletion. Only four proteins of Group 3 were identified in both U and L cells. Sixty-eight proteins with increased abundance in U cells upon *RTG1* deletion, but not upon *MKS1* deletion, were strongly enriched for the GO Process and Component terms "mitochondrial translation", "mitochondrial gene expression" and "mitochondrial ribosome" (Table S3A). All proteins in these GO categories were only repressed by Rtg1p in U cells and did not exhibit any other Rtg1p and/or Mks1p regulation in either U or L cells (Table S3A). An additional GO category "long-chain fatty acid biosynthetic process" also fulfilled significance criteria ($p < 0.01$) for only Rtg1p-regulated proteins in U cells. No significant GO term category was identified in Group 3 proteins in L cells.

In acidic-phase colonies only 16 proteins belong to Group 3 (Figure 1B, Table S3B); nine in upper and eight in lower cells with only one protein identified in both. Only two proteins were also repressed by Mks1p. Group 3 proteins in acidic-phase colonies were enriched ($p < 0.01$) only for the GO Component term "mitochondrion".

3. Discussion

Previous findings indicate the importance of mitochondria and the RTG pathway in the development and differentiation of yeast colonies [12–14,17]. In particular, Rtg-/Mks1p—dependent regulation of expression of specific proteins was identified in specific subpopulations—Ato2p and Ady2p expression in U cells and Cit2p expression in upper L cells [13]. These two RTG branches (Ato- and Cit-) are thus differently regulated in relation to TORC1, one of the described repressors of the RTG pathway. The Ato- branch in U cells is active in the presence of active TORC1, while the Cit-branch in L cells is active under conditions of inactive TORC1 [13]. The situation in L cells is thus consistent with described inhibition of the RTG pathway by TORC1 [3]. In acidic phase colonies (prior to U/L cell differentiation) TORC1 is inactive in all cells and only Cit2p is induced via the RTG pathway in upper parts of these colonies [13]. In this work, we aimed to identify other important proteins, the expression of which is controlled by the RTG pathway in specific cell subpopulations, and thus to identify cellular processes that the RTG pathway controls in colonies. The basis was an extensive analysis of proteomes of differentiated colony cells in two developmental phases (acidic and alkali) followed by subsequent microscopic analyses of selected GFP-labeled proteins in colonies and their more detailed quantification. To increase the significance of conclusions, arising from the proteomic data, we took advantage of the fact that two pairs of strains with different combinations of RTG-pathway

gene deletions could be expected to exhibit similar phenotypes, in terms of pathway activity, as compared with the wt strain. Therefore, in subsequent analyses and interpretation of results, we took into account only those proteins that were significantly regulated in both members of the relevant pair of mutants versus the wt. In this way, we revealed three main groups of proteins, expression of which was regulated differently in colonial cells. The first group included proteins with conventional RTG pathway regulation—induction by Rtg1p and repression by Mks1p. The second group included proteins that were induced by Rtg1p but were not significantly repressed by Mks1p in the same cells. The third group included proteins that were repressed by Rtg1p.

Group 1, classically RTG-regulated proteins were enriched for GO terms, mainly related to various metabolic processes. Proteomic analysis, along with detailed microscopic and Western blot analyses of selected GFP-labeled proteins, showed that most of these proteins localize predominantly to U cells in differentiated alkali-phase colonies, and thus had similar expression profiles to the previously identified Ato-branch of RTG signaling [13] and are activated by RTG in the presence of active TORC1. In contrast, only Dld3p and Ree1p had similar proteomic profiles to the previously identified Cit2p, being more abundant in L than in U cells of wt colonies. Like Cit2p, Dld3p was expressed in the upper parts of acidic-phase colonies and then degraded in U cells but remained in L cells of alkali-phase colonies, consistent with inactive TORC1. In contrast to Cit2p, Dld3p was also present in lower L cells. Several Group 1 proteins were also detected in younger acidic-phase colonies, where proteomics showed no significant differences between upper and lower cell abundance. However, analyses of the amounts of selected proteins (Western blot, microscopy) mostly showed slightly higher amounts of these proteins in upper cells in both microcolonies and giant colonies in acidic phase. Deletion of *MKS1* usually strongly increased levels of these proteins especially in upper cells of acidic-phase colonies (similar to Ato proteins), suggesting strong Mks1p repression in conditions of inactive TORC1, whereas their derepression in U cells in the absence of Mks1p was less pronounced than in L cells. The level of Dld3p-GFP was also strongly increased in lower cells. Analysis of mRNA of selected genes confirmed that Rtg/Mks1p-dependent effects, detected at protein level, correlate with respective mRNA-level effects. These results confirmed that RTG-pathway regulation of identified proteins occurs mostly at the transcriptional level.

The proteins included in Group 2 were also positively controlled by Rtg1p, but unlike Group 1, were not significantly repressed by Mks1p in the same cells. In contrast, in some cases the absence of Mks1p led to a reduction in protein levels, as did the absence of Rtg1p. The largest cluster of such proteins was identified in U cells, where they are mainly involved in the biosynthesis of some amino acids. Although these proteins are not repressed by Mks1p in U cells, deletion of *MKS1* slightly increased the amount of many of them in L cells. It is known from previous findings that the amount of Cit2p in U cells, unlike L cells, is not increased by deletion of *MKS1*, although Cit2p is classically regulated by the RTG pathway [13]. It is therefore possible that Group 2 U cell-upregulated proteins, related to amino acid metabolism, are conventionally regulated by Rtg/Mks1p, but that Mks1p repression does not operate (or is less effective) in U cells and so expression of these proteins is Mks1p-repressed in L cells but not U cells of wt colonies. The fact that many of these proteins are significantly more highly expressed in U than in L cells of wt colonies supports this possibility. The number of Group 2 proteins, identified in L cells was half that, identified in U cells, and these proteins were not expressed upon *MKS1* deletion in any cell type. The only significant functional GO group identified among these proteins related to the biosynthesis of vitamins, especially thiamine. Only 13 proteins in acidic-phase colonies belong to Group 2, and although no significant functional group was identified, the genes for thiamine biosynthesis clearly belonged to this group, even in the acidic phase.

Which processes may be activated by Rtg proteins (whether or not repressed by Mks1p) in differentiated colony subpopulations? In U cells, a prominent subset of Rtg-activated proteins consists of proteins enabling the synthesis of acetyl-CoA, its transport to mitochondria and its consumption via the TCA cycle (Figure 6). One route by which

acetyl-CoA (produced from acetate or by β-oxidation of fatty acids) reaches the mitochondria involves the carnitine shuttle, followed by acetyl-CoA consumption through the TCA cycle. The second requires extra-mitochondrial Cit2p to produce citrate from oxaloacetate and acetyl-CoA. Citrate then either enters the mitochondria to be fed into the TCA cycle or is used in the glyoxylate cycle [3,19–22]. The first acetyl-CoA route appears to run in U cells under the control of the RTG pathway (Figure 6A), as the Acs1p, Cat2p, Yat1p, Yat2p, Cit3p and Aco2p proteins are characteristic of these cells and their expression depends on Rtg proteins. Expression of genes for some of these proteins has previously been shown to be elevated in respiratory-deficient cells, but without being linked to RTG pathway regulation [3]. Another subset of Rtg-regulated proteins in U cells is involved in nitrogen (NH_3) recycling and glutamate formation, such as Gdh3p and Gdh1p forming glutamate from α-ketoglutarate and NH_3 and Sno1p/Snz1p putative glutaminases converting glutamine to glutamate and NH_3 (Figure 6A). These data, together with identification of a large group of proteins involved in amino acid biosynthesis (among Group 2 proteins), suggest that regulating the use of nutritive compounds (waste products and/or compounds provided by L cells [14,18]) for synthesis of amino acids could be a major role of the RTG pathway in U cells (Figure 6A). In addition, higher amounts of both Cit3p and Icl2p suggest that U cells may cope better with some side-products of amino acid metabolism, such as propionyl-CoA (which may arise from degradation of branched chain amino acids), by its removal via the methyl citrate pathway and pyruvate formation [9,23,24].

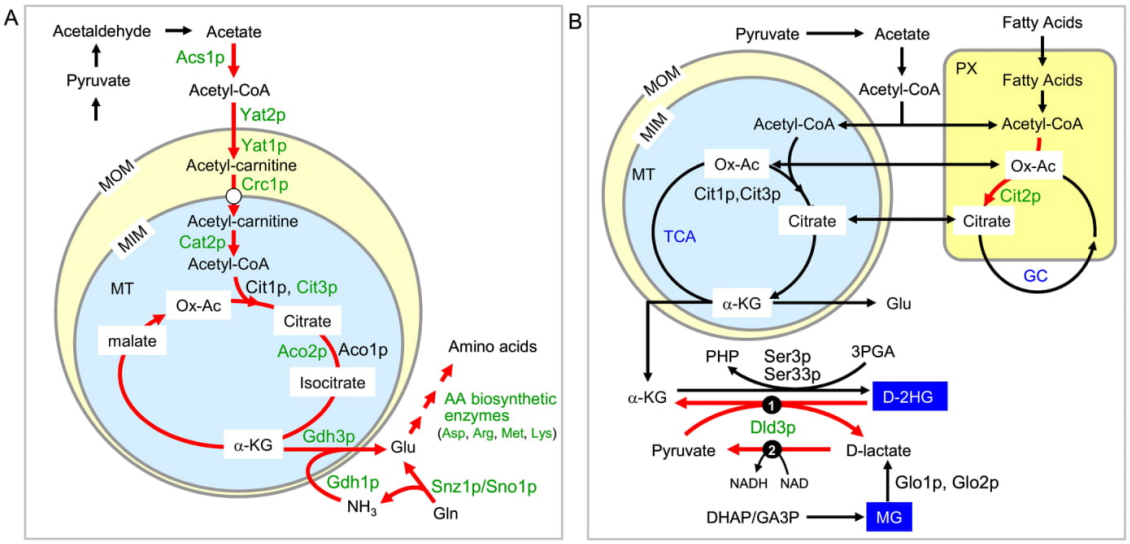


Figure 6. Scheme of metabolic functions, induced by RTG pathway in U cells (**A**) and L cells (**B**). Proteins, the level of which increased upon Rtg protein activation, are in green, and related pathways in red. MOM, mitochondrial outer membrane; MIM, mitochondrial inner membrane; MT, mitochondria; PX, peroxisome; TCA, TCA cycle; GC, glyoxylate cycle; Ox-Ac, oxaloacetate; α-KG, α-ketoglutarate; PHP, 3-phosphohydroxypyruvate; 3PGA, 3-phosphoglycerate; D-2HG, D-2-hydroxyglutarate; MG, methylglyoxal; DHAP, dihydroxyacetone phosphate and GA3P, glyceraldehyde 3-phosphate. Reaction 1—predicted function of Dld3p in D-2HG metabolism; reaction 2—predicted function of Dld3p in MG metabolism.

In contrast to U cells, L cells express Cit2p and probably use the second acetyl-CoA route preferentially (Figure 6B). Cit2p could also contribute to consumption of propionyl-CoA (if present) in peroxisomes, but this would lead to the accumulation of toxic 2-methylcitrate [23,24]. Besides Cit2p, the RTG pathway controls Dld3p expression in L cells. Both genes, *DLD3*, encoding a cytoplasmic D-lactate dehydrogenase, and *CIT2* for citrate synthase, are genes classically controlled by the RTG pathway under different conditions and different cultures [25,26]. Dld3p could be involved in detoxification of

D-2-hydroxyglutarate (D-2HG) [27] and methylglyoxal [28]. Major intracellular sources of D-2HG are Ser3p and Ser33p 3-phosphoglycerate dehydrogenases that catalyze the first step in serine and glycine biosynthesis and have additional α-ketoglutarate reductase activity, oxidizing 3-phosphoglycerate and reducing α-ketoglutarate to D-2HG. Dld3p was recently shown to have transhydrogenase activity, oxidizing D-2HG to α-ketoglutarate and reducing pyruvate to D-lactate [27]. MG arises non-enzymatically from dihydroxyacetone phosphate/glyceraldehyde 3-phosphate [28–30] and accumulates under conditions of impaired glucose metabolism or oxidative stress. In yeast, the cellular MG level peaks during the diauxic shift. MG is converted to D-lactate by Glo1p and Glo2p or Glo4p. Cytosolic Dld3p oxidizes D-lactate to pyruvate, which can participate in gluconeogenesis [28]. These findings are consistent with L cell characteristics as stressed cells with active gluconeogenesis [14,18]. Thus, according to the literature, yeast Dld3p can catalyze the bidirectional conversion of D-lactate to pyruvate and back in the cytosol. However, a recently postulated model in mammals hypothesizes that only the first part of the lactate-pyruvate cycle—the reduction of pyruvate to L-lactate (the end product of mammalian glycolysis)-takes place in the cytosol, while the reverse reaction—oxidation of L-lactate to pyruvate-takes place in the mitochondrial matrix [31]. It is therefore possible that in yeast, oxidation of D-lactate to pyruvate also localizes to the mitochondria, where a minor form of lactate dehydrogenase Dld2p is present. However, the level of Dld2p is not controlled by the RTG pathway (not shown).

The third group consists of proteins, negatively regulated by Rtg1p, most of which are not affected by the presence or absence of Mks1p. Like Group 2 proteins, Group 3 proteins are almost absent from acidic-phase colonies, and were most abundant in U cells. Of the 78 proteins of this group, identified in U cells, 55 proteins are only repressed by Rtg1p specifically in U cells (they show no other Rtg/Mks1p dependent regulation in any other cells). In colonies of the wt strain, most of these proteins have elevated levels in L cells as compared to U cells. GO functional analysis revealed with high significance that 31 of these proteins are related to mitochondrial functions, including proteins involved in mitochondrial translation and ribosome composition and function.

The results of this work confirmed the importance of mitochondrial regulation in colonies and identified processes, specifically regulated by Rtg factors. In comparison with the previously identified Ato- and Cit2- specific pathways, we showed that most proteins classically controlled by the RTG pathway have a similar expression and regulation profile to proteins of the Ato-branch of the pathway and that most Rtg1p-dependent regulations occur in U cells under conditions of active TORC1 and high intracellular glutamine [14]. A relatively lower number of genes is regulated by this pathway in L cells and such regulations are often already apparent in younger colonies in acidic phase. In addition to genes, classically regulated via Rtg induction and Mks1p repression, a significant number of genes, mainly genes involved in amino acid biosynthesis, are regulated in U cells only by Rtg1p. Mks1p moderately regulates some of these genes only in L cells. The main effect of TORC1 (and glutamine) on RTG signaling (often measured via expression of *CIT2*, the most commonly used marker of the RTG pathway) presumably occurs via phosphorylation of the Mks1p repressor, which in complex with Bmh1p/Bmh2p inhibits the Rtg1p-Rtg3p heterodimeric transcriptional activator. In low glutamine and inactive TORC1 conditions, Mks1p phosphorylation is reduced or eliminated leading to RTG activation involving Rtg2p. The model assumes that different levels of Mks1p phosphorylation, due to glutamine/TORC1 activity, contribute to the intensity of the RTG response under different nutrient conditions (e.g., different nitrogen sources) [6]. Phosphorylation of Rtg3p may or may not reflect the level of Mks1p phosphorylation, TORC1 activity, and activation of Cit2p target protein expression. In most cases, activation of the RTG response (measured via Cit2p expression) is associated with dephosphorylation of Rtg3p, but its hyperphosphorylation after prolonged inhibition of TORC1 by rapamycin has also been described. However, such hyperphosphorylation did not reduce Cit2p expression [32]. RTG regulation (including Mks1p repression) may also be TORC1 independent [33], and involvement of Rtg2p

(a key activator of the pathway) assumes a signal from dysfunctional (or less functional) mitochondria [34,35]. These and other findings show that the RTG pathway responds in different ways to external conditions, and that many of the mechanisms involved in this response have not yet been elucidated. In colonies, Cit2p expression roughly correlates with inactive TORC1 (L cells and upper cells of acidic colonies), but the vast majority of RTG-dependent activations occur under conditions of active TORC1 (and high glutamine) in U cells either repressed or not repressed via Mks1p. These findings imply that, under certain metabolic conditions, part of the RTG response occurs independently of TORC1 and is, presumably, only partially dependent on Mks1p, implying another hitherto unknown RTG regulation by a specific cell state. Because U cells exhibit a number of non-standard regulations, including parallel TORC1 activity, active autophagy, active Gcn4p, and others [14,36], atypical regulation of the RTG pathway in relation to TORC1/gln is another example of the metabolic uniqueness of these cells. One possible explanation is that Rtg2p (which is a key activator in both the Cit- and Ato- branches of colonial RTG signaling, [13] activates the RTG pathway partially independently of Mks1p and thus part of the pathway is constitutively active in U cells. However, since some typical RTG responsive genes (*CIT2*, *DLD3*) are excluded from this activation, further (as yet unidentified) regulations are likely, which contribute to the specificity of RTG pathway-induced targets in different colony cell subpopulations.

Positive Rtg factor regulation in U cells is related to metabolic (mostly biosynthetic) processes together with processes involved in transport of metabolic intermediates to mitochondria (such as the carnitine shuttle), which together contribute to recycling available nutritive compounds to support the biosynthesis of amino acids, which is a typical characteristic of U cells described previously [14]. The expression of a number of genes for these proteins is elevated in respiratory-deficient cells [3], consistent with findings of decreased respiration in U cells [12,14,17,37]. Some of the Rtg-induced processes (e.g., carboxylic acid metabolism, carnitine shuttle) are already Rtg-dependent in younger colonies in the acidic phase, where they are often strongly repressed by Mks1p. In differentiated alkali-phase colonies, these processes are strongly activated by Rtg1p in U cells, where the repressive function of Mks1p is attenuated. In contrast, Mks1p repression of these processes remains strong in L cells, where the induction effect of Rtg1p is weak. In accordance, proteins belonging to these groups often exhibit higher expression in U than in L cells of wt colonies.

In addition to the above-described, positive regulation of metabolic processes by the RTG signaling pathway, we identified a significant functional group of proteins, uniquely repressed by Rtg1p in U cells, without any Mks1p effect. Proteins of this group participate in mitochondrial translation, mainly being components of mitochondrial ribosomes. In wt colonies, most of these proteins exhibit higher accumulation in L cells than U cells. It was shown by transcriptomic studies, that expression of nuclear genes encoding mitochondrial ribosome proteins is co-regulated in yeast [38] being repressed by glucose and anaerobiosis [39,40]. The RTG pathway thus also appears to directly or indirectly contribute to the reduction of mitochondrial respiration in U cells, a prominent metabolic characteristic that these cells share with cells of solid tumors [14]. Changes in the expression of genes encoding mitoribosomal proteins have been associated with tumorigenesis in mammals [41].

4. Materials and Methods

4.1. Yeast Strains and Cultivation

All *S. cerevisiae* strains in this study (Table 1) were derived from the laboratory strain BY4742 from the Euroscarf collection. C-terminal GFP fusion strains were prepared using a GFP integrative cassette amplified by PCR from plasmid pKT127 (kanr) [42]. Gene knock-outs were prepared using deletion integrative cassette amplified by PCR from plasmid pUG6 + 25 (natr) [13,43]. The primer sequences are listed in Table S4. Yeast cell transformation was performed according to [44]; 100 µg/mL nourseothricin and 400 µg/mL G418 were used to select yeast transformants.

Giant colonies were inoculated onto the agar surface (six per plate), using 10 µL drops of 12 mg/mL cell suspension. Microcolonies were grown at an approximate density of 5×10^3 per plate. All colonies were grown on respiratory GMA medium (1% yeast extract, 3% glycerol, 1% ethanol, 2% agar, and 10 mM $CaCl_2$, with or without the pH indicator bromocresol purple) at 28 °C.

4.2. Colony Imaging Microscopy

To analyze internal structure of colonies we used two photon excitation confocal microscopy (2PE-CM) or fluorescence microscopy of thin colony cross sections as described earlier [14,45,46]. Briefly, 2PE-CM colonies embedded in agarose were cut vertically in the middle. The cut surface was placed on a coverslip and side views of internal colony structure were obtained by a confocal scanning microscope (AxioObserver.Z1) with a confocal module LSM 880 NLO and MP (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with Ti:Sapphire femtosecond laser Chameleon Ultra II (Coherent, Santa Clara, CA, USA) and 25×/0.8 or 63×/1.2 water immersion LD LCI Plan- or C-Apochromat objectives, respectively. An excitation wavelength of 920 nm and emission bandwidth of 480–595 nm was used for GFP. To obtain images of whole colonies we combined two images from neighboring fields of view. For fluorescence microscopy, thin sections were prepared from colonies embedded in 3% agarose using a Leica VT1200S vibrating microtome (Leica, Wetzlar, Germany) [14,47] and observed by an Axio Observer.Z1 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with an Axiocam 506 and an Apochromat 10×/0.45W objective or an Apochromat 63×/1.20 W using ZEN 2012 (blue edition) software. Filter sets for GFP fluorescence: 450–490 nm and 500–550 nm for excitation and emission, respectively.

4.3. Cell Biomass Harvesting

By micromanipulation, two types of cells, upper/U and lower/L cells, were harvested from upper and lower parts of giant colonies, in the acidic and alkali developmental phases. Purity of the fractions was checked by microscopy using DIC contrast. Alternatively, the biomass of whole microcolonies was harvested. The harvested biomass was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C and used for proteomic, Western- or Northern-blot analyses.

4.4. Proteomics Analysis

Comparison of proteomes was performed by nano LC-MS/MS analysis. Cells harvested from giant colonies were disrupted in 100 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB), 10 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine, 50 mM chloroacetamide buffer containing 2% sodium deoxycholate using glass beads five-times for 20 s using a FastPrep (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); after the first two runs, samples were heated for 5 min at 95 °C. Protein aliquots (30 µg per sample; determined by bicinchoninic acid assay, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used for MS sample preparation. Samples were further processed using SP3 beads according to [48]. Briefly, 5 µL of SP3 beads were added to 30 µg of protein in lysis buffer and made up to 50 µL with 100 mM TEAB. Protein binding was induced by addition of ethanol to 60% (*v*/*v*) final concentration. Samples were mixed and incubated for 5 min at laboratory temperature. After binding, the tubes were placed into a magnetic rack and the unbound supernatant was discarded. Beads were subsequently washed twice with 180 µL of 80% ethanol. After washing, samples were digested with trypsin (trypsin/protein ratio 1/30), acidified with TFA to 1% final concentration, and peptides were desalted using C18 disks (CDS Analytical; Oxford, PA, USA). Peptides (2 µg) from each sample were separated on Nano reversed phase columns (EASY-Spray column a 50 cm × 75 µm ID, PepMap C18, 2 µm particles using a 1 h elution gradient and analyzed in DDA mode on an Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) mass spectrometer. For each strain and condition, three biological replicates were analyzed. Resulting raw files were processed in MaxQuant (v. 1.6.10.43) and searches performed against the latest version of *S. cerevisiae* Uniprot database and common contaminant database.

Perseus (v.1.6.1.1.) and Excel 2013 were used for further analysis. Significance of protein abundance differences between two strains was determined using the unpaired two-tailed t test. p values of 0.05 or less were considered statistically significant. Functional categories enriched in particular comparisons of proteomes were identified using the GO term finder at SGD (https://www.yeastgenome.org/goTermFinder, accessed on 16 October 2020) (p-value 0.01). The proteomics data were deposited at the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (identifier PXD026077).

4.5. Determination of the Amount of GFP-Labeled Proteins by Western Blot

Western blot detection of GFP labeled proteins was performed as described [49]. Briefly, biomass harvested from microcolonies or giant colonies was disrupted using glass beads and proteins in cell lysates (4–25 μg in a well) were subjected to SDS-PAGE and proteins transferred to a PVDF membrane. GFP was detected by mouse monoclonal horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-GFP antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). The peroxidase signal was visualized using Super Signal West Pico (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA) on Super RX medical X-ray film (Fomei, Hradec Králové, Czech Republic). Membranes stained with Coomassie blue were used as loading controls (Figures S1 and S2).

4.6. RNA Isolation and Northern Blotting

Cell biomass of fractions harvested from giant colonies was suspended in TES buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) and total RNA was isolated using the hot phenol method [15]. The total RNA concentration was quantified with a Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Fifteen milligrams of total RNA were denatured in loading buffer with formamide, separated in 1.5% agarose gel and then transferred to a positively charged nylon membrane (Amersham HybondTM-XL, GE Healthcare Ltd., Hatfield, UK). The membranes were hybridized with specific DNA probes prepared with a Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2 (Takara, Kusatsu, Japan) using the PCR fragments of particular genes and [α-32P] dCTP (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). The rRNA content was visualized by GelRed staining (Biotium, Fremont, CA, USA) and used as a loading control (Figure S3).

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22115597/s1.

Author Contributions: Conceptualization, Z.P. and L.V.; data curation, V.P., L.V. and Z.P.; formal analysis, Z.P., L.V. and D.W.; funding acquisition, Z.P., L.V. and K.F.; investigation, V.P., K.F., J.M., L.V., A.P., O.H. and Z.P.; methodology V.P., L.V., and Z.P.; project administration, Z.P. and L.V.; resources, Z.P. and L.V.; software, D.W.; supervision, Z.P. and L.V.; validation, V.P., K.F., J.M., L.V., A.P., O.H. and Z.P; visualization, Z.P., L.V. and V.P.; writing—original draft preparation, Z.P.; writing—review and editing, V.P., K.F., J.M., L.V., O.H., D.W. and Z.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Czech Science Foundation 19-09381S, GAUK 958216 and RVO 61388971.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Publicly available datasets were analyzed in this study. This data can be found here: http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD026077.

Acknowledgments: The authors thank K. Harant and P. Talacko from OMICS Proteomics Core Facility Laboratory of BIOCEV (Charles University, Faculty of Science) for performing LC-MS/MS.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Guha, M.; Avadhani, N.G. Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics. *Mitochondrion* **2013**, *13*, 577–591. [CrossRef] [PubMed]
2. Jazwinski, S.M. The retrograde response: A conserved compensatory reaction to damage from within and from without. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2014**, *127*, 133–154. [PubMed]
3. Liu, Z.; Butow, R.A. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu. Rev. Genet.* **2006**, *40*, 159–185. [CrossRef] [PubMed]
4. Ferreira Junior, J.R.; Spirek, M.; Liu, Z.; Butow, R.A. Interaction between Rtg2p and Mks1p in the regulation of the RTG pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **2005**, *354*, 2–8. [CrossRef]
5. Liu, Z.; Sekito, T.; Spirek, M.; Thornton, J.; Butow, R.A. Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 401–411. [CrossRef]
6. Dilova, I.; Aronova, S.; Chen, J.C.; Powers, T. Tor signaling and nutrient-based signals converge on Mks1p phosphorylation to regulate expression of Rtg1.Rtg3p-dependent target genes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46527–46535. [CrossRef]
7. Dilova, I.; Chen, C.Y.; Powers, T. Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 389–395. [CrossRef]
8. Chelstowska, A.; Butow, R.A. RTG genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18141–18146. [CrossRef]
9. Epstein, C.B.; Waddle, J.A.; Hale IV, W.; Dave, V.; Thornton, J.; Macatee, T.L.; Garner, H.R.; Butow, R.A. Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 297–308. [CrossRef]
10. Guaragnella, N.; Coyne, L.P.; Chen, X.J.; Giannattasio, S. Mitochondria-cytosol-nucleus crosstalk: Learning from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2018**, *18*, foy088. [CrossRef]
11. Palkova, Z.; Vachova, L. Yeast cell differentiation: Lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2016**, *57*, 110–119. [CrossRef]
12. Vachova, L.; Palkova, Z. How structured yeast multicellular communities live, age and die? *FEMS Yeast Res.* **2018**, *18*, foy033. [CrossRef]
13. Podholová, K.; Plocek, V.; Rešetárová, S.; Kučerová, H.; Hlaváček, O.; Váchová, L.; Palková, Z. Divergent branches of mitochondrial signaling regulate specific genes and the viability of specialized cell types of differentiated yeast colonies. *Oncotarget* **2016**, *7*, 15299–15314. [CrossRef]
14. Cap, M.; Stepanek, L.; Harant, K.; Vachova, L.; Palkova, Z. Cell differentiation within a yeast colony: Metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Mol. Cell* **2012**, *46*, 436–448. [CrossRef]
15. Palkova, Z.; Devaux, F.; Ricicova, M.; Minarikova, L.; Le Crom, S.; Jacq, C. Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 3901–3914. [CrossRef]
16. Palkova, Z.; Janderova, B.; Gabriel, J.; Zikanova, B.; Pospisek, M.; Forstova, J. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* **1997**, *390*, 532–536. [CrossRef]
17. Vachova, L.; Hatakova, L.; Cap, M.; Pokorna, M.; Palkova, Z. Rapidly developing yeast microcolonies differentiate in a similar way to aging giant colonies. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2013**, *2013*, 102485. [CrossRef]
18. Cap, M.; Vachova, L.; Palkova, Z. Longevity of U cells of differentiated yeast colonies grown on respiratory medium depends on active glycolysis. *Cell Cycle* **2015**, *14*, 3488–3497. [CrossRef]
19. Franken, J.; Kroppenstedt, S.; Swiegers, J.H.; Bauer, F.F. Carnitine and carnitine acetyltransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A role for carnitine in stress protection. *Curr. Genet.* **2008**, *53*, 347–360. [CrossRef]
20. Van Rossum, H.M.; Kozak, B.U.; Niemeijer, M.S.; Duine, H.J.; Luttik, M.A.; Boer, V.M.; Kotter, P.; Daran, J.M.; van Maris, A.J.; Pronk, J.T. Alternative reactions at the interface of glycolysis and citric acid cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2016**, *16*, fow017. [CrossRef]
21. Xiberras, J.; Klein, M.; Nevoigt, E. Glycerol as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* based bioprocesses—Knowledge gaps regarding the central carbon catabolism of this 'non-fermentable' carbon source. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 107378. [CrossRef] [PubMed]
22. Xiberras, J.; Klein, M.; Prosch, C.; Malubhoy, Z.; Nevoigt, E. Anaplerotic reactions active during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glycerol. *FEMS Yeast Res.* **2020**, *20*, foz086. [CrossRef] [PubMed]
23. Graybill, E.R.; Rouhier, M.F.; Kirby, C.E.; Hawes, J.W. Functional comparison of citrate synthase isoforms from *S. cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *465*, 26–37. [CrossRef] [PubMed]
24. Nakatsukasa, K.; Nishimura, T.; Byrne, S.D.; Okamoto, M.; Takahashi-Nakaguchi, A.; Chibana, H.; Okumura, F.; Kamura, T. The ubiquitin ligase SCF(Ucc1) acts as a metabolic switch for the glyoxylate cycle. *Mol. Cell* **2015**, *59*, 22–34. [CrossRef]
25. Liu, Z.; Butow, R.A. A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol. Cell Biol.* **1999**, *19*, 6720–6728. [CrossRef]
26. Schuller, H.J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **2003**, *43*, 139–160. [CrossRef]
27. Becker-Kettern, J.; Paczia, N.; Conrotte, J.F.; Kay, D.P.; Guignard, C.; Jung, P.P.; Linster, C.L. *Saccharomyces cerevisiae* forms D-2-Hydroxyglutarate and couples its degradation to D-lactate formation via a cytosolic transhydrogenase. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 6036–6058. [CrossRef]

28. Pallotta, M.L. Mitochondrial involvement to methylglyoxal detoxification: D-Lactate/Malate antiporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2012**, *102*, 163–175. [CrossRef]
29. De Bari, L.; Atlante, A.; Armeni, T.; Kalapos, M.P. Synthesis and metabolism of methylglyoxal, S-D-lactoylglutathione and D-lactate in cancer and Alzheimer's disease. Exploring the crossroad of eternal youth and premature aging. *Ageing Res. Rev.* **2019**, *53*, 100915. [CrossRef]
30. Stewart, B.J.; Navid, A.; Kulp, K.S.; Knaack, J.L.; Bench, G. D-Lactate production as a function of glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2013**, *30*, 81–91. [CrossRef]
31. Passarella, S.; Schurr, A. l-Lactate transport and metabolism in mitochondria of Hep G2 cells-The Cori cycle revisited. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 120. [CrossRef]
32. Dilova, I.; Powers, T. Accounting for strain-specific differences during RTG target gene regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 112–119. [CrossRef]
33. Tate, J.J.; Cox, K.H.; Rai, R.; Cooper, T.G. Mks1p is required for negative regulation of retrograde gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* but does not affect nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 20477–20482. [CrossRef]
34. Giannattasio, S.; Liu, Z.; Thornton, J.; Butow, R.A. Retrograde response to mitochondrial dysfunction is separable from *TOR1/2* regulation of retrograde gene expression. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 42528–42535. [CrossRef]
35. Sekito, T.; Thornton, J.; Butow, R.A. Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*, 2103–2115. [CrossRef]
36. Palkova, Z.; Wilkinson, D.; Vachova, L. Aging and differentiation in yeast populations: Elders with different properties and functions. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 96–108. [CrossRef]
37. Wilkinson, D.; Marsikova, J.; Hlavacek, O.; Gilfillan, G.D.; Jezkova, E.; Aaløkken, R.; Vachova, L.; Palkova, Z. Transcriptome remodeling of differentiated cells during chronological ageing of yeast colonies: New insights into metabolic differentiation. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2018**, *2018*, 4932905. [CrossRef]
38. Ihmels, J.; Friedlander, G.; Bergmann, S.; Sarig, O.; Ziv, Y.; Barkai, N. Revealing modular organization in the yeast transcriptional network. *Nat. Genet.* **2002**, *31*, 370–377. [CrossRef]
39. Graack, H.R.; Wittmann-Liebold, B. Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *Biochem. J.* **1998**, *329*, 433–448. [CrossRef]
40. Lai, L.C.; Kosorukoff, A.L.; Burke, P.V.; Kwast, K.E. Metabolic-state-dependent remodeling of the transcriptome in response to anoxia and subsequent reoxygenation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **2006**, *5*, 1468–1489. [CrossRef]
41. Kim, H.J.; Maiti, P.; Barrientos, A. Mitochondrial ribosomes in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2017**, *47*, 67–81. [CrossRef]
42. Sheff, M.A.; Thorn, K.S. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2004**, *21*, 661–670. [CrossRef]
43. Guldener, U.; Heck, S.; Fielder, T.; Beinhauer, J.; Hegemann, J.H. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2519–2524. [CrossRef]
44. Gietz, R.D.; Woods, R.A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **2002**, *350*, 87–96.
45. Vachova, L.; Chernyavskiy, O.; Strachotova, D.; Bianchini, P.; Burdikova, Z.; Fercikova, I.; Kubinova, L.; Palkova, Z. Architecture of developing multicellular yeast colony: Spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 1866–1877. [CrossRef]
46. Vachova, L.; Stovicek, V.; Hlavacek, O.; Chernyavskiy, O.; Stepanek, L.; Kubinova, L.; Palkova, Z. Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *J. Cell Biol.* **2011**, *194*, 679–687. [CrossRef]
47. Marsikova, J.; Pavlickova, M.; Wilkinson, D.; Vachova, L.; Hlavacek, O.; Hatakova, L.; Palkova, Z. The Whi2p-Psr1p/Psr2p complex regulates interference competition and expansion of cells with competitive advantage in yeast colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 15123–15131. [CrossRef]
48. Hughes, C.S.; Moggridge, S.; Muller, T.; Sorensen, P.H.; Morin, G.B.; Krijgsveld, J. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 68–85. [CrossRef]
49. Vachova, L.; Kucerova, H.; Devaux, F.; Ulehlova, M.; Palkova, Z. Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 494–504. [CrossRef]

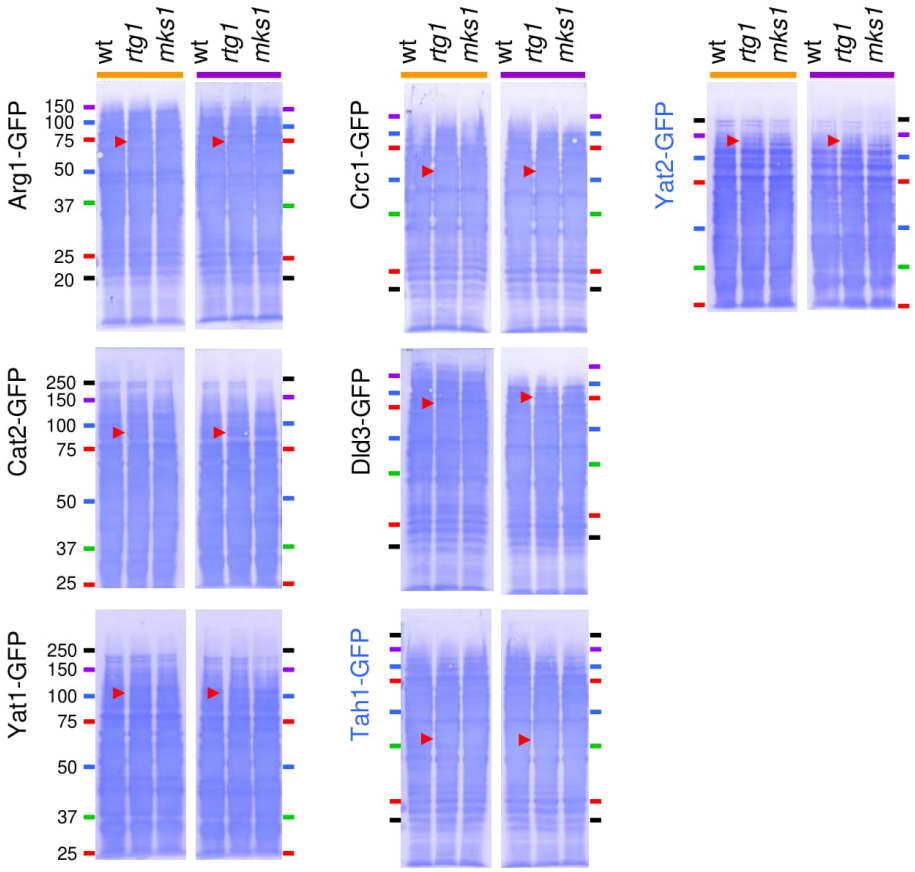


Figure S1: Western blot loading controls. Loading controls for Figure 3A. Arrows indicate the position of a particular protein on a Western blot.

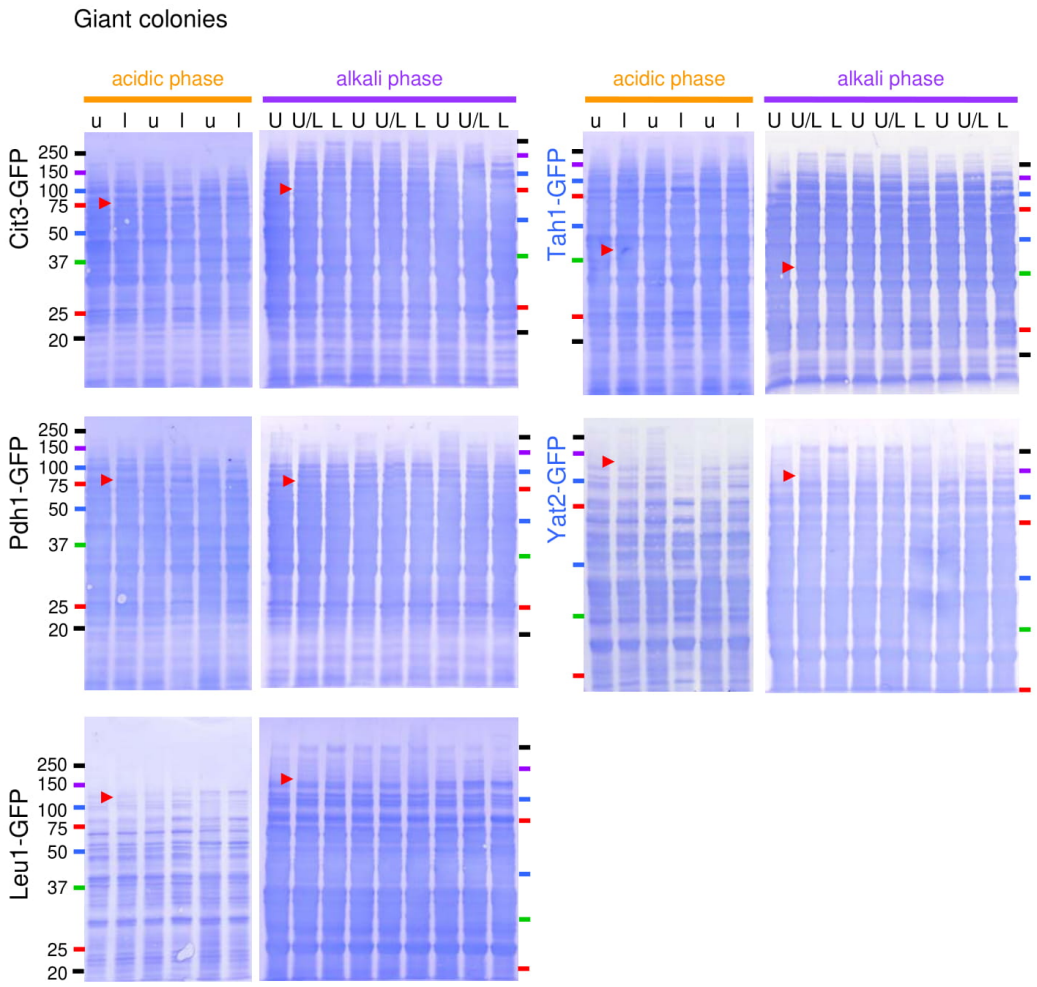


Figure S2: Western blot loading controls. Loading controls for Figure 3B.
Arrows indicate the position of a particular protein on a Western blot.

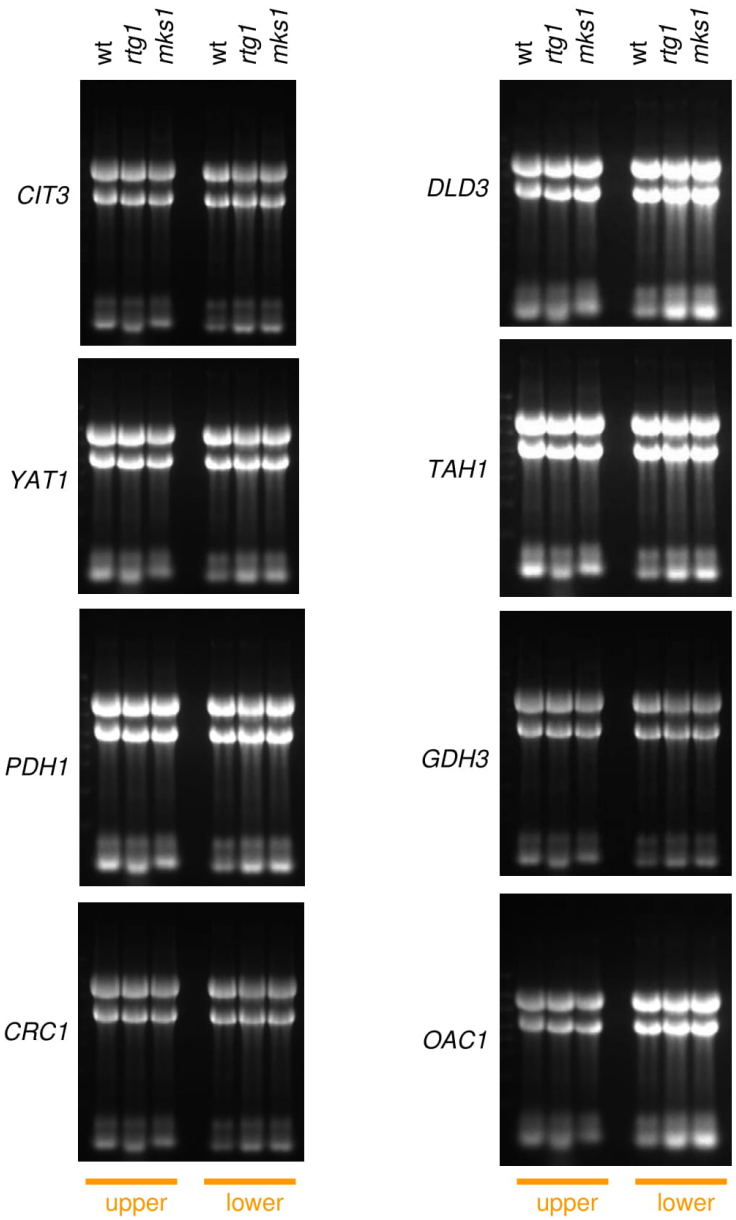


Figure S3: Northern blot loading controls. Loading controls for Figure 5.

Table S1-A: Proteins, downregulated in both BY-rtg1 and BY-rtg1mks1 and upregulated in both BY-mks1 and BY-rtg2mks1, compared with the wt in U- and/or L-cells of alkali-phase colonies

	SAMPLE = U CELLS								SAMPLE = L CELLS										
	wt-U/rtg1-U		wt-U/rtg1mks1-U		wt-U/mks1-U		wt-U/rtg2mks1-U		wt-L/rtg1-L		wt-L/rtg1mks1-L		wt-L/mks1-L		wt-L/rtg2mks1-L		U cells (wt)/L cells (wt)		
Gene	ratio (log2)	p-value	ratio (log2)	p-value	ratio (log2)	p-value	ratio (log2)	p-value	ratio (log2)	p-value	ratio (log2)	p-value	ratio (log2)	p-value	ratio (log2)	p-value	ratio (log2)	p-value	Protein
CRC1	9,14	s	9,14	s	-1,24	0,005807	-1,79	0,000242	8,55	s	8,55	s	-4,79	0,000000	-4,78	0,000000		NS	Mitochondrial carnitine carrier
ADH4	8,34	s	8,34	s	-2,28	0,007570	-1,42	0,008218		NS		NS	-9,83	s	-9,01	s	8,34	s	Alcohol dehydrogenase 4
SRY1	7,33	s	3,66	0,014597	5,38	s	1,18	0,013470	5,70	s	5,70	s	-2,75	0,000096	-2,79	0,000117	1,63	0,006239	Threo-3-hydroxyaspartate ammonia-lyase
OAC1	5,81	s	5,81	s	-1,83	0,004391	-1,96	0,003339	3,64	s	3,64	s	-5,69	s	-5,65	0,001354		NS	Mitochondrial oxaloacetate transport protein
ATO2	4,84	0,000059	6,50	s	-2,73	0,000014	-2,57	0,000013	4,90	s	4,90	s	-7,13	0,000033	-7,27	0,000030	3,90	0,000345	Ammonia transport outward protein 2
YAT1	4,73	0,000381	3,19	0,000263	-0,83	0,015591	-0,87	0,001572	2,62	0,000028	2,55	0,000149	-3,45	0,000000	-3,52	0,000001		NS	Putative mitochondrial carnitine O-acetyltransferase
CIT3	4,26	0,009065	5,61	0,004178	-2,39	0,001321	-2,50	0,001043	6,86	s	6,86	s	-5,74	0,000065	-5,71	0,000068	2,62	0,004018	Citrate synthase 3
TAH1	3,79	s	3,79	s	-4,82	0,002448	-5,67	0,002410		NS		NS	-10,58	s	-10,81	s		NS	TPR repeat-containing protein associated with Hsp90
ERR3	3,15	0,000008	3,04	0,000501	-0,92	0,002080	-0,91	0,002748		NS		NS	-3,46	0,000216	-3,26	0,000269	4,35	0,000105	Enolase-related protein 3
ARG1	3,00	0,000003	2,85	0,000029		NS		NS	0,86	0,001871	0,87	0,001633	-2,18	0,000023	-2,18	0,000024	1,84	0,000080	Argininosuccinate synthase
ADY2	2,96	0,000003	2,53	0,000020	1,01	0,001035	1,03	0,001029	8,89	s	8,89	s	-3,30	0,000012	-3,31	0,000018	3,82	0,000007	Accumulation of dyads protein 2
YAT2	2,65	0,000073	2,36	0,000574	-0,81	0,003564	-0,89	0,000484	2,00	0,000212	1,80	0,000131	-3,64	0,000011	-3,74	0,000008		NS	Carnitine O-acetyltransferase YAT2
PDH1	2,61	0,000071	2,02	0,000146	-2,27	0,000076	-2,41	0,000020	3,95	0,000015	4,68	0,000001	-4,37	0,000000	-4,39	0,000000		NS	Probable 2-methylcitrate dehydratase
FDH1/FDH2	2,48	0,000056	5,72	s	-1,20	0,012326	-1,15	0,001036		NS		NS	-5,69	s	-3,60	s	9,53	s	Formate dehydrogenase 1 / Putative formate dehydrogenase 2
ACO2	1,89	0,000270	2,17	0,001094		NS		NS	1,53	0,000336	2,96	0,038690	-2,51	0,000039	-2,44	0,000047	1,66	0,000288	Homocitrate dehydratase, mitochondrial
LYS4	1,77	0,000002	1,62	0,003552		NS		NS	1,84	0,002417	1,37	0,000084	-1,40	0,000077	-1,44	0,000060		NS	Homoaconitase, mitochondrial
LEU4	1,74	0,000034	1,64	0,000053	-0,74	0,003353	-0,85	0,001041	1,11	0,000071	0,94	0,000120	-2,48	0,000003	-2,47	0,000003		NS	2-isopropylmalate synthase
LEU1	1,70	0,000011	1,40	0,000050	-2,29	0,000022	-2,73	0,000002	1,06	0,000154	0,80	0,000457	-4,70	0,000000	-4,72	0,000000		NS	3-isopropylmalate dehydratase
GDH3	1,69	0,000036	1,89	0,000028		NS		NS	2,97	0,005882	1,98	0,000005	-1,43	0,000000	-1,46	0,000000	1,01	0,000001	NADP-specific glutamate dehydrogenase 2
HIS4	1,69	0,000019	1,74	0,000098	2,15	0,000172	1,91	0,000038	1,04	0,000444	0,94	0,000422	-2,02	0,000005	-1,97	0,000006	2,61	0,000005	Histidine biosynthesis trifunctional protein
CAT2	1,68	0,000016	1,61	0,000046	-0,83	0,006697	-1,03	0,000957		NS		NS	-3,19	0,000001	-3,24	0,000001	0,78	0,000638	Carnitine O-acetyltransferase, mitochondrial
ALD5	1,60	0,000067	1,21	0,000142		NS		NS	1,11	0,000483	0,65	0,000913	-1,36	0,000037	-1,39	0,000063		NS	Aldehyde dehydrogenase 5, mitochondrial
MAE1	1,59	0,000151	1,46	0,000070		NS		NS	1,52	0,000560	0,92	0,002808	-1,99	0,000031	-1,98	0,000054		NS	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial
MET14	1,49	0,001892	1,11	0,000603	2,16	0,000070	1,86	0,000965	8,31	s	1,08	0,014546	-1,32	0,006734	-1,29	0,011031	1,93	0,001816	Adenylyl-sulfate kinase
HIS5	1,41	0,000006	1,41	0,000023	1,39	0,000002	1,37	0,000030	0,84	0,002215	0,66	0,004340	-0,99	0,000609	-1,01	0,000838	1,76	0,000071	Histidinol-phosphate aminotransferase
SNO1	1,33	0,001794	1,21	0,001782		NS		NS	4,44	0,008231	1,34	0,000802	-1,69	0,000094	-1,79	0,000311	1,08	0,002764	Protein of unconfirmed function; forms a putative glutamine amidotransferase complex with Snz1p, with Sno1p serving as the glutaminase
SNZ1	1,07	0,000416	0,83	0,000162		NS		NS	0,90	0,001115	0,59	0,004462	-1,38	0,000060	-1,57	0,000022		NS	Subunit of a two-component pyridoxal-5′-phosphate synthase; forms a complex with Sno1p that functions as an active glutaminase
ICL2	1,02	0,009343	1,05	0,004934	-2,50	0,000080	-2,61	0,000157		NS		NS	-5,78	0,001074	-5,84	0,001032	3,32	0,008971	Mitochondrial 2-methylisocitrate lyase
ACS1	0,94	0,000414	0,84	0,000686		NS		NS	2,44	0,000011	2,05	0,000005	-1,98	0,000003	-1,98	0,000009	1,20	0,000172	Acetyl-coenzyme A synthetase 1
MET10		NS		NS		NS		NS	7,29	s	7,29	s	-1,63	0,001991	-1,62	0,001198	1,10	0,003548	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein component
ADE17		NS		NS	1,06	0,001376	0,84	0,000832	1,53	0,000017	1,32	0,000104	-0,82	0,000087	-0,83	0,000573	1,41	0,000054	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17 (Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase; IMP cyclohydrolase)
CIT2		NS		NS	-1,57	0,001586	-1,09	0,004258	0,87	0,008283	1,03	0,003560	-3,41	0,000005	-3,50	0,000006	-1,32	0,003162	Citrate synthase, peroxisomal
CPS1		NS		NS		NS		NS	1,07	0,001769	0,89	0,000760	-1,40	0,000027	-1,31	0,000072	0,91	0,000166	Carboxypeptidase S
DLD3		NS		NS	-5,91	0,000879	-5,62	0,001081	5,14	s	6,52	s	-7,09	0,000021	-7,27	0,000011	-4,43	0,003423	D-lactate dehydrogenase [cytochrome] 3
PAR32		NS		NS		NS		NS	1,43	0,019286	0,59	0,003210	-1,18	0,000035	-1,10	0,000491		NS	Protein PAR32
REE1		NS		NS	-0,84	0,000468	-0,79	0,000035	1,56	0,000025	1,14	0,000083	-0,92	0,000143	-0,93	0,000233	-1,23	0,000051	Regulation of enolase protein 1
SPS100		NS		NS		NS		NS	1,07	0,000019	0,95	0,000045	-0,88	0,003254	-0,81	0,000257	2,26	0,000023	Sporulation-specific wall maturation protein

s	significant (protein detected in one strain but not detected in the other)
ns	non-significant

Terms from the Process Ontology of gene_association.sgd with p-value <= 0.01

Gene Ontology term	Cluster frequency	Genome frequency	Corrected P-value	FDR	False Positives	Genes annotated to the term
carboxylic acid metabolic process	28 of 38 genes, 73.7%	426 of 7166 genes, 5.9%	9,53E-25	0,00%	0	YAT2, MAE1, YAT1, PDH1, SNZ1, CAT2, HIS5, FDH1, ALD5, CIT3, ERR3, SRY1, ADH4, CIT2, ACS1, LEU1, LEU4, SNO1, CRC1, ACO2, YIL160C, ARG1, MET14, ICL2, HIS4, DLD3, GDH3, LYS4
monocarboxylic acid metabolic process	15 of 38 genes, 39.5%	179 of 7166 genes, 2.5%	8,33E-13	0,00%	0	CAT2, PDH1, YIL160C, YAT2, YAT1, MAE1, CRC1, ACS1, ALD5, ERR3, SRY1, CIT3, DLD3, FDH1, ICL2
cellular amino acid metabolic process	14 of 38 genes, 36.8%	249 of 7166 genes, 3.5%	2,08E-09	0,00%	0	HIS4, GDH3, ADH4, SRY1, LYS4, LEU1, SNO1, LEU4, MAE1, ACO2, SNZ1, ARG1, MET14, HIS5
carboxylic acid biosynthetic process	12 of 38 genes, 31.6%	194 of 7166 genes, 2.7%	2,80E-08	0,00%	0	SRY1, GDH3, ALD5, LEU1, LYS4, HIS4, DLD3, MET14, HIS5, ARG1, LEU4, ACO2
cellular amino acid biosynthetic process	10 of 38 genes, 26.3%	129 of 7166 genes, 1.8%	1,35E-07	0,00%	0	MET14, HIS5, ARG1, ACO2, LEU4, LEU1, LYS4, SRY1, GDH3, HIS4
fatty acid metabolic process	8 of 38 genes, 21.1%	65 of 7166 genes, 0.9%	2,02E-07	0,00%	0	ICL2, CIT3, PDH1, YIL160C, YAT2, CRC1, YAT1, CAT2
carnitine metabolic process	3 of 38 genes, 7.9%	4 of 7166 genes, 0.1%	9,54E-05	0,00%	0	YAT1, YAT2, CAT2
propionate metabolic process	3 of 38 genes, 7.9%	4 of 7166 genes, 0.1%	9,54E-05	0,00%	0	CIT3, PDH1, ICL2
short-chain fatty acid metabolic process	3 of 38 genes, 7.9%	6 of 7166 genes, 0.1%	0,00047	0,00%	0	ICL2, PDH1, CIT3
tricarboxylic acid metabolic process	4 of 38 genes, 10.5%	31 of 7166 genes, 0.4%	0,00332	0,10%	0,02	ACO2, CIT2, ARG1, CIT3

Terms from the Component Ontology of gene_association.sgd with p-value <= 0.01

Gene Ontology term	Cluster frequency	Genome frequency	Corrected P-value	FDR	False Positives	Genes annotated to the term
mitochondrion	20 of 38 genes, 52.6%	1236 of 7166 genes, 17.2%	3,22E-05	0,00%	0	ADY2, OAC1, LEU4, YIL160C, MAE1, LYS4, DLD3, ACO2, CIT3, PDH1, CIT2, YAT1, ALD5, ICL2, ATO2, CRC1, ACS1, GDH3, ADH4, CAT2

Table S1-B: Proteins, downregulated in both BY-rtg1 and BY-rtg1mks1 and upregulated in both BY-mks1 and BY-rtg2mks1, compared with the wt in upper and/or lower cells of acidic-phase colonies

	SAMPLE = upper CELLS								SAMPLE = lower CELLS										
	wt-upper/rtg1-upper		wt-upper/rtg1mks1-upper		wt-upper/mks1-upper		wt-upper/rtg2mks1-upper		wt-lower/rtg1-lower		wt-lower/rtg1mks1-lowe		wt-lower/mks1-lower		wt-lower/rtg2mks1-lower		upper cells /lower cells (wt)		
Gene	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	Protein
PDH1	8,85	s	6,54	0,000742	-4,38	0,000002	-4,61	0,000001	8,72	s	8,38	s	-5,20	0,000023	-5,09	0,000036		NS	Probable 2-methylcitrate dehydratase
CRC1	8,10	s	8,10	s	-5,19	0,000036	-5,52	0,000029	7,48	s	7,48	s	-5,88	0,000008	-5,87	0,000008		NS	Mitochondrial carnitine carrier
GDH3	8,04	s	3,54	0,002435	-0,85	0,035668	-1,21	0,003688	9,30	s	7,47	s	-1,41	0,001734	-1,48	0,000418		NS	NADP-specific glutamate dehydrogenase 2
ADY2	7,44	s	7,44	s	-2,69	0,001061	-3,25	0,000032	7,59	s	7,59	s	-3,86	0,000119	-3,94	0,000071		NS	Accumulation of dyads protein 2
ACO2	6,72	s	2,85	0,003516	-2,11	0,003081	-2,55	0,000005		NS		NS	-2,51	0,000120	-2,44	0,002347		NS	Homocitrate dehydratase, mitochondrial
CIT3	6,51	s	6,51	s	-5,61	0,000014	-6,06	0,000004	4,76	s	4,76	s	-7,29	0,000003	-7,28	0,000001	1,74	0,00095	Citrate synthase 3
CIT2	5,00	0,049367	4,79	0,011144	-3,94	0,000010	-4,56	0,000002	5,62	0,003951	6,89	0,036194	-5,01	0,000029	-4,41	0,000057		NS	Citrate synthase, peroxisomal
LYS4	4,85	0,035592	2,79	0,035555	-2,68	0,001245	-3,06	0,000851		NS		NS	-3,11	0,000019	-2,83	0,002537		NS	Homoaconitase, mitochondrial
ICL2	4,43	s	4,43	s	-6,37	0,000331	-6,66	0,000175	2,54	s	2,54	s	-8,53	0,000024	-8,25	0,000629		NS	Mitochondrial 2-methylisocitrate lyase
YAT2	4,22	0,003824	3,35	0,000745	-3,28	0,000002	-3,71	0,000001	4,81	0,002467	3,86	0,000019	-3,88	0,000005	-4,08	0,000010		NS	Carnitine O-acetyltransferase YAT2
DLD3	3,68	s	3,68	s	-9,39	0,000283	-9,70	s		NS		NS	-12,10	s	-12,20	s		NS	D-lactate dehydrogenase [cytochrome] 3
YAT1	3,33	0,001338	2,38	0,001633	-3,32	0,000042	-3,49	0,000006	3,88	0,000187	2,99	0,003781	-3,57	0,000029	-3,68	0,000040		NS	Putative mitochondrial carnitine O-acetyltransferase
HIS4	3,08	0,008274	0,88	0,002243	-1,78	0,000004	-1,96	0,000004	2,36	0,008233	1,29	0,021287	-2,54	0,000680	-2,47	0,000710	0,83	0,03503	Histidine biosynthesis trifunctional protein;Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase;Phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase;Histidinol
MAE1	2,50	0,007384	1,14	0,000279	-1,88	0,000694	-2,16	0,000030	2,24	0,000180	0,98	0,004561	-2,15	0,000015	-2,25	0,000017		NS	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial
ACS1	2,39	0,000510	1,91	0,000794	-1,53	0,004223	-1,96	0,000407	2,55	0,000342	1,96	0,000284	-2,16	0,000503	-2,12	0,000219		NS	Acetyl-coenzyme A synthetase 1
ADE17	2,05	0,000814	1,10	0,008019		NS		NS	1,20	0,009389	0,96	0,018286	-0,98	0,019115	-0,96	0,019145		NS	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17;Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase;IMP
SPS100	1,83	0,000053	1,13	0,002217	-0,72	0,030031	-1,17	0,005340	2,06	0,005995	1,12	0,017973		NS		NS		NS	Sporulation-specific wall maturation protein
LEU4	1,27	0,003536	0,86	0,004804	-2,23	0,000635	-2,61	0,000066		NS		NS	-2,49	0,000120	-2,43	0,000043		NS	2-isopropylmalate synthase
CAT2	0,96	0,000659	0,89	0,000018	-3,02	0,000003	-3,40	0,000003	1,18	0,015267	1,32	0,000428	-3,49	0,000005	-3,53	0,000011		NS	Carnitine O-acetyltransferase, mitochondrial
ARG1	0,95	0,008001	0,87	0,022430	-1,78	0,000466	-1,99	0,000303		NS		NS	-2,27	0,001060	-2,22	0,001075		NS	Argininosuccinate synthase
HOM3	0,93	0,001775	0,87	0,002571	-1,43	0,000988	-1,45	0,000305		NS		NS	-1,65	0,000023	-1,64	0,000017		NS	Aspartokinase
ALD5		NS		NS	-1,12	0,001377	-1,48	0,000172	1,52	0,003289	0,87	0,027257	-1,46	0,000545	-1,40	0,000025		NS	Aldehyde dehydrogenase 5, mitochondrial
NDE2		NS		NS	-1,58	0,000541	-1,56	0,000571	1,87	0,009695	0,94	0,000702	-1,22	0,000373	-1,00	0,000410		NS	External NADH-ubiquinone oxidoreductase 2, mitochondrial

s	significant (protein detected in one strain but not detected in the other)
ns	non-significant

Table S2-A: Proteins, downregulated in both BY-rtg1 and BY-rtg1mks1 compared with the wt in U and/or L-cells of alkali-phase colonies

	SAMPLE = U CELLS								SAMPLE = L CELLS										
	BY-U/rtg1-U		BY-U/rtg1mks1-U		BY-U/mks1-U		BY-U/rtg2mks1-U		BY-L/rtg1-L		BY-L/rtg1mks1-L		BY-L/mks1-L		BY-L/rtg2mks1-L		U cells (wt)/L cells (wt)		
Gene	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	Protein
ZPS1	10,33	s	10,33	s		NS		NS		NS		NS	-8,96	s	-8,49	s	8,47	s	Protein ZPS1
ZRT1	9,64	s	9,64	s		NS		NS		NS		NS	-10,12	s	-10,17	s	9,64	s	Zinc-regulated transporter 1
ARG3	9,21	s	7,48	s		NS		NS		NS		NS	-6,54	0,026182	-7,56	0,019824	6,15	0,032503	Ornithine carbamoyltransferase
YLL056C	7,36	s	7,36	s	2,12	0,000068	2,13	0,000033		NS		NS		NS		NS	3,91	0,002672	Uncharacterized protein YLL056C
GTO3	6,22	s	8,18	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS	8,18	s	Glutathione S-transferase omega-like 3
GTO1	5,83	0,000980	5,21	0,000368	3,10	0,000326	2,89	0,000338		NS		NS	-2,74	s	-3,33	s	8,52	s	Glutathione S-transferase omega-like 1
STR3	5,67	s	2,01	0,000066	1,77	0,000121	1,35	0,005808		NS		NS		NS		NS	5,38	s	Cystathionine beta-lyase
SRX1	5,51	s	1,37	0,006017		NS		NS		NS		NS		NS		NS	1,53	0,002659	Sulfiredoxin
ARG8	3,53	0,002360	3,37	0,001330		NS		NS		NS		NS	-3,80	0,000562	-3,88	0,000541	2,80	0,004434	Acetylornithine aminotransferase, mitochondrial
AAD14	2,63	0,000012	2,12	0,004924	0,88	0,003754	0,99	0,003652	8,41	s	1,94	0,000715	3,28	0,000312	3,49	0,000451	1,80	0,000462	Putative aryl-alcohol dehydrogenase AAD14
MET5	2,48	0,000062	2,16	0,000806	1,93	0,000019	1,79	0,000031		NS		NS	-1,89	0,000005	-1,85	0,000034	2,51	0,000007	Sulfite reductase [NADPH] subunit beta
MET3	2,45	0,000452	1,91	0,001030	5,22	0,000173	6,64	0,001571		NS		NS		NS		NS	7,98	S	Sulfate adenylyltransferase
ARG7	2,35	0,000027	2,14	0,000020	1,10	0,000167	0,86	0,001421		NS		NS	-1,67	0,000113	-1,74	0,000068	1,40	0,000271	Arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ, mitochondrial
SSA4	2,27	0,000004	2,39	0,000044		NS		NS		NS		NS		NS		NS	2,02	0,000001	Heat shock protein SSA4
ARG5,6	2,24	0,000001	2,13	0,000023		NS		NS		NS		NS	-2,42	0,000005	-2,44	0,000013	2,42	0,000004	Protein ARG5,6, mitochondrial (N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate
HOM3	1,93	0,000005	1,79	0,000024	1,11	0,000561	1,09	0,000274		NS		NS	-1,54	0,000003	-1,58	0,000001	1,60	0,000008	Aspartokinase
ARG4	1,93	0,000140	1,97	0,000078		NS		NS		NS		NS	-1,89	0,000011	-1,95	0,000009	1,34	0,000366	Argininosuccinate lyase
CTT1	1,86	0,000001	1,78	0,000062		NS		NS		NS		NS		NS		NS	1,99	0,000003	Catalase T
CPA2	1,82	0,000004	1,70	0,000003	1,00	0,000637	0,95	0,000291		NS		NS	-1,92	0,000010	-1,92	0,000003	1,23	0,000034	Carbamoyl-phosphate synthase arginine-specific large chain
TMT1	1,69	0,000039	1,75	0,000266	1,25	0,000235	1,05	0,000769		NS		NS	-1,49	0,000207	-1,55	0,000051	1,57	0,000164	Trans-aconitate 3-methyltransferase
XYL2	1,66	0,000077	1,55	0,001886		NS		NS		NS		NS		NS		NS	7,62	s	D-xylulose reductase
YKL050C	1,60	0,000148	2,10	0,008998		NS		NS		NS		NS	-2,18	0,033399	-1,68	0,059550	6,10	0,000654	Uncharacterized protein YKL050C
YLR271W	1,55	0,003876	1,84	0,002275	0,89	0,003721	1,15	0,002704		NS		NS		NS		NS	3,99	0,000837	Uncharacterized protein YLR271W
YJL045W	1,54	0,000523	1,41	0,000362		NS		NS		NS		NS		NS		NS	1,64	0,000428	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 2, mitochondrial
SSA3	1,52	0,000026	1,57	0,001055		NS		NS		NS		NS		NS		NS	2,67	0,000009	Heat shock protein SSA3
BDH2	1,51	0,003228	1,13	0,012950		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Probable diacetyl reductase [(R)-acetoin forming] 2
SHH4	1,42	0,014917	1,50	0,005663		NS		NS		NS		NS		NS		NS	2,61	0,000816	Mitochondrial inner membrane protein SHH4
YJR154W	1,42	0,000028	1,17	0,001665		NS		NS	1,31	0,000413	0,85	0,002077		NS		NS		NS	Uncharacterized protein YJR154W
YDL218W	1,35	0,001989	1,47	0,006821		NS		NS		NS		NS		NS		NS	3,26	0,000039	Uncharacterized membrane protein YDL218W
ODC2	1,31	0,000271	1,64	0,002321	0,87	0,000603	1,24	0,000346		NS		NS	-1,17	0,000720	-1,22	0,000577		NS	Mitochondrial 2-oxodicarboxylate carrier 2
ILV3	1,30	0,000923	1,14	0,000859		NS		NS		NS		NS	-1,28	0,000120	-1,30	0,000094		NS	Dihydroxy-acid dehydratase, mitochondrial
HSP32	1,21	0,000188	1,17	0,000072		NS		NS		NS		NS		NS		NS	2,35	0,000031	Probable glutathione-independent glyoxalase HSP32
STR2	1,20	0,005363	0,80	0,004062	1,08	0,004481	0,94	0,000884		NS		NS		NS		NS	0,91	0,009643	Cystathionine gamma-synthase
HIS1	1,18	0,001270	1,33	0,001713	1,37	0,000393	1,49	0,000743		NS		NS	-1,02	0,004632	-0,98	0,003706	1,46	0,000310	ATP phosphoribosyltransferase
YHI9	1,18	0,000919	1,27	0,000122	1,19	0,000052	1,16	0,000793		NS		NS		NS		NS	0,99	0,000199	Uncharacterized isomerase YHI9
GDH1	1,17	0,000244	1,37	0,003771		NS		NS		NS		NS	1,50	0,000026	1,48	0,000062	-1,33	0,000252	NADP-specific glutamate dehydrogenase 1
GLT1	1,13	0,000041	1,05	0,001396		NS		NS		NS		NS	-1,31	0,000028	-1,37	0,000024		NS	Glutamate synthase [NADH]
LYS9	1,09	0,000065	1,10	0,000268		NS		NS		NS		NS		NS		NS	1,06	0,000280	Saccharopine dehydrogenase [NADP(+), L-glutamate-forming]
ALD3	1,08	0,000257	1,12	0,001144		NS		NS		NS		NS		NS		NS	2,67	0,000011	Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] 2
SHH3	1,07	0,034133	1,31	0,001297		NS		NS		NS		NS	-3,12	0,002722	-3,03	0,020204	4,99	0,000623	Mitochondrial inner membrane protein SHH3
ADH5	1,06	0,010377	1,02	0,009135	1,26	0,006975	0,86	0,021897		NS		NS	-2,75	0,000005	-2,74	0,000006	1,92	0,000959	Alcohol dehydrogenase 5
AAC1	1,02	0,002026	1,19	0,001409		NS		NS		NS		NS		NS		NS	1,48	0,000096	ADP,ATP carrier protein 1
HOM2	1,00	0,000105	0,92	0,000199		NS		NS		NS		NS	-0,95	0,000020	-0,94	0,000019		NS	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase
BNA3	1,00	0,004718	0,92	0,004149	0,91	0,001252	0,85	0,010100		NS		NS		NS		NS	0,90	0,002241	Probable kynurenine--oxoglutarate transaminase BNA3
MXR1	0,99	0,037198	1,05	0,013121		NS		NS		NS		NS		NS		NS	1,73	0,006617	Peptide methionine sulfoxide reductase
ARO3	0,99	0,000470	1,02	0,000435	0,92	0,001103	0,88	0,000912		NS		NS		NS		NS	0,92	0,002365	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, phenylalanine-inhibited
MET17	0,97	0,000593	1,02	0,001630	1,14	0,000152	1,01	0,000335		NS		NS	-1,65	0,000060	-1,70	0,000065	2,05	0,000055	Protein MET17;O-acetylhomoserine sulfhydrylase;O-acetylserine sulfhydrylase
SSE2	0,93	0,000547	0,90	0,001302		NS		NS		NS		NS		NS		NS	1,60	0,000012	Heat shock protein homolog SSE2
ILV2	0,93	0,000077	0,90	0,000067		NS		NS		NS		NS	-1,92	0,000001	-2,00	0,000003		NS	Acetolactate synthase catalytic subunit, mitochondrial
PET10	0,93	0,002682	1,15	0,002298		NS		NS		NS		NS		NS		NS	2,09	0,000085	Protein PET10
HSP31	0,92	0,002343	1,13	0,001090		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Glutathione-independent glyoxalase HSP31
HSP82	0,90	0,000519	0,86	0,000500		NS		NS		NS		NS		NS		NS	1,12	0,000870	ATP-dependent molecular chaperone HSP82
LYS20	0,89	0,000001	0,83	0,000006		NS		NS		NS		NS	-1,61	0,000001	-1,63	0,000000	0,88	0,000000	Homocitrate synthase, cytosolic isozyme
LYS1	0,86	0,000506	0,80	0,000168		NS		NS		NS		NS	-1,43	0,000015	-1,49	0,000017		NS	Saccharopine dehydrogenase [NAD(+), L-lysine-forming]
ARO4	0,86	0,000261	0,81	0,000681		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, tyrosine-inhibited
ALD2	0,82	0,000144	0,88	0,001206		NS		NS		NS		NS		NS		NS	1,85	0,000020	Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] 1
PNS1	0,81	0,000924	1,07	0,018833	0,84	0,001379	1,05	0,000136		NS		NS		NS		NS	2,74	0,000002	Protein PNS1
YJR096W	0,81	0,000002	0,83	0,004059		NS		NS		NS		NS		NS		NS	2,58	0,000016	Uncharacterized oxidoreductase YJR096W

YDJ1	0,78	0,000540	0,84	0,000241		NS		NS		NS		NS		NS		NS			NS	Mitochondrial protein import protein MAS5
POT1	0,71	0,000399	0,82	0,003874		NS		NS	3,00	0,005079	1,07	0,000168		NS		NS		1,74	0,000011	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal
ADH2	-0,79	0,000000	-1,02	0,000358		NS		NS	1,85	0,000008	1,49	0,000023		NS		NS			NS	Alcohol dehydrogenase 2
THI73	-0,85	0,002686	-1,44	0,004020		NS		NS	2,59	0,002440	3,83	s		NS		NS			NS	Thiamine pathway transporter THI73
TMA10		NS		NS		NS		NS	1,20	0,013308	0,85	0,027265		NS		NS			NS	Translation machinery-associated protein 10
INO1	-1,09	0,000087	-1,26	0,007687	-1,35	0,000373	-0,91	0,000733	1,01	0,000553	0,89	0,000600	2,89	0,000012	2,38	0,000166		-2,77	0,000009	Inositol-3-phosphate synthase
THI5		NS		NS		NS		NS	7,55	s	7,55	s	7,55	s	7,55	s			NS	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin
TRM11		NS		NS		NS		NS	6,45	s	4,65	s		NS		NS			NS	tRNA (guanine(10)-N2)-methyltransferase
MLP2		NS		NS		NS		NS	5,99	s	5,99	s		NS		NS			NS	Protein MLP2
THI12		NS		NS		NS		NS	5,39	0,000230	2,67	0,000496	3,46	0,000174	3,55	0,000165			NS	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin
VPS68		NS		NS		NS		NS	4,75	s	6,72	s		NS		NS		0,88	0,009857	Vacuolar protein sorting-associated protein 6
POL12		NS		NS		NS		NS	4,74	s	4,74	s		NS		NS			NS	DNA polymerase alpha subunit B
ENA1		NS		NS		NS		NS	3,01	0,013714	2,21	0,001433		NS		NS		1,11	0,007629	Sodium transport ATPase 1;Sodium transport ATPase 5
THI4		NS		NS		NS		NS	2,70	0,000067	1,90	0,000210	2,77	0,000219	2,64	0,000152		-0,83	0,005377	Thiamine thiazole synthase
AVT7		NS		NS		NS		NS	2,46	0,006803	2,34	0,020943		NS		NS			NS	Vacuolar amino acid transporter 7
ARO10		NS		NS		NS		NS	2,14	0,005786	1,69	0,018957		NS		NS		-5,78	0,013632	Transaminated amino acid decarboxylase
RGI2		NS		NS		NS		NS	1,38	0,000385	0,75	0,000717		NS		NS		1,53	0,000097	Respiratory growth induced protein 2
SNO3		NS		NS		NS		NS	1,24	0,000395	0,84	0,001735	0,87	0,000493	0,86	0,000684			NS	Probable pyridoxal 5-phosphate synthase subphosphate synthase subunit SNO2
POX1		NS		NS	-1,07	0,000040	-1,14	0,000032	1,13	0,000808	1,01	0,000830		NS		NS			NS	Acyl-coenzyme A oxidase
GPX2		NS		NS	5,08	s	1,37	0,001418	1,12	0,008021	1,24	0,000786		NS		NS		-0,96	0,002134	Glutathione peroxidase 2
HHO1		NS		NS		NS		NS	1,11	0,000728	0,77	0,002319		NS		NS		-1,32	0,000161	Histone H1
OPI3		NS		NS		NS		NS	1,05	0,000077	0,80	0,002444		NS		NS		-0,81	0,000548	Phosphatidyl-N-methylethanolamine N-meth
URA1		NS		NS		NS		NS	1,05	0,000005	0,92	0,000029		NS		NS		-1,88	0,000039	Dihydroorotate dehydrogenase (fumarate)
YNL208W		NS		NS		NS		NS	1,01	0,003008	0,83	0,008622		NS		NS			NS	Uncharacterized protein YNL208W
YLR179C		NS		NS		NS		NS	0,98	0,000708	1,15	0,000147		NS		NS		-1,05	0,001128	Uncharacterized protein YLR179C
FAA2		NS		NS		NS		NS	0,92	0,000584	0,76	0,002398		NS		NS			NS	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 2
HPT1		NS		NS	1,26	0,000216	1,09	0,000010	0,82	0,001215	0,85	0,001074		NS		NS			NS	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransf
AHP1		NS		NS		NS		NS	0,78	0,002877	0,83	0,002793		NS		NS			NS	Peroxiredoxin type-2

s	significant (protein detected in one strain but not detected in the other)
ns	non-significant

RTG - induced in U cells

Terms from the Process Ontology of gene_association.sgd with p-value <= 0.01

Gene Ontology term	Cluster frequency	Genome frequency	Corrected P-value	FDR	False Positives	Genes annotated to the term
cellular amino acid biosynthetic process	24 of 59 genes, 40.0%	129 of 7166 genes, 1.8%	1,01E-24	0,00%	0	HOM3, ARO3, ARG4, ARG7, LYS1, ALD2, ARG5,6, HIS1, ARO4, CPA2, STR3, ILV3, GDH1, ALD3, ILV2, ARG3, MET17, MET5, STR2, HOM2, GLT1, LYS20, ARG8, LYS9
oxoacid metabolic process	33 of 59 genes, 55.0%	445 of 7166 genes, 6.2%	2,89E-22	0,00%	0	HOM2, LYS20, ARG8, LYS1, ARG5,6, HIS1, SHH4, HSP32, BNA3, STR2, MET17, MET5, GLT1, ALD3, ARG3, ILV2, YIL160C, LYS9, HSP31, ALD2, ARG7, HOM3, ARG4, YJL045W, ARO3, CPA2, ARO4, GDH1, ILV3, STR3, SHH3, MET3, ADH5
cellular amino acid metabolic process	27 of 59 genes, 45.0%	249 of 7166 genes, 3.5%	1,04E-21	0,00%	0	LYS9, LYS20, ARG8, MET17, MET5, HOM2, STR2, GLT1, ALD3, ILV2, ARG3, ARO4, CPA2, ILV3, STR3, GDH1, ADH5, MET3, BNA3, LYS1, ARG7, ALD2, HIS1, ARG5,6, HOM3, ARO3, ARG4
alpha-amino acid biosynthetic process	19 of 59 genes, 31.7%	120 of 7166 genes, 1.7%	1,58E-17	0,00%	0	ARG3, ILV2, GLT1, STR2, HOM2, MET17, ARG8, LYS20, LYS9, ARG4, HOM3, HIS1, ARG5,6, ARG7, LYS1, ILV3, STR3, GDH1, CPA2
glutamine family amino acid biosynthetic process	8 of 59 genes, 13.3%	26 of 7166 genes, 0.4%	6,83E-09	0,00%	0	GDH1, CPA2, ARG8, GLT1, ARG5,6, ARG7, ARG4, ARG3
arginine biosynthetic process	6 of 59 genes, 10.0%	11 of 7166 genes, 0.2%	3,93E-08	0,00%	0	ARG5,6, ARG7, CPA2, ARG4, ARG3, ARG8
aspartate family amino acid biosynthetic process	8 of 59 genes, 13.3%	51 of 7166 genes, 0.7%	2,36E-06	0,00%	0	LYS20, LYS9, STR3, HOM3, HOM2, STR2, LYS1, MET17
lysine biosynthetic process	5 of 59 genes, 8.3%	14 of 7166 genes, 0.2%	2,16E-05	0,00%	0	HOM2, LYS1, LYS9, LYS20, HOM3
homoserine metabolic process	5 of 59 genes, 8.3%	16 of 7166 genes, 0.2%	4,66E-05	0,00%	0	HOM3, STR3, MET17, STR2, HOM2
sulfur amino acid metabolic process	7 of 59 genes, 11.7%	50 of 7166 genes, 0.7%	5,01E-05	0,00%	0	MET3, HOM3, STR3, MET5, MET17, STR2, HOM2
sulfur amino acid biosynthetic process	6 of 59 genes, 10.0%	38 of 7166 genes, 0.5%	0,00019	0,00%	0	HOM3, MET5, MET17, HOM2, STR2, STR3
protein refolding	5 of 59 genes, 8.3%	28 of 7166 genes, 0.4%	0,00097	0,00%	0	SSA4, HSP82, SSA3, YDJ1, SSE2
methionine biosynthetic process	5 of 59 genes, 8.3%	34 of 7166 genes, 0.5%	0,00264	0,06%	0,02	STR3, STR2, HOM2, MET17, HOM3

RTG - induced in L cells

Terms from the Process Ontology of gene_association.sgd with p-value <= 0.01

Gene Ontology term	Cluster frequency	Genome frequency	Corrected	FDR	False Positives	Genes annotated to the term
pyrimidine-containing compound biosynthetic process	4 of 30 genes, 13.3%	38 of 7166 genes, 0.5%	0,00322	0,00%	0,00	THI12, THI5, THI4, URA1
thiamine biosynthetic process	3 of 30 genes, 10.0%	14 of 7166 genes, 0.2%	0,00450	1,00%	0,02	THI4, THI12, THI5
vitamin biosynthetic process	4 of 30 genes, 13.3%	52 of 7166 genes, 0.7%	0,01134	0,14%	0,08	THI5, THI12, THI4, SNO3

Table S2-B: Proteins, downregulated in both BY-rtg1 and BY-rtg1mks1 compared with the wt in upper and/or lower cells of acidic-phase colonies

	SAMPLE = upper CELLS								SAMPLE = lower CELLS										
	BY-U/rtg1-U		BY-U/rtg1mks1-U		BY-U/mks1-U		BY-U/rtg2mks1-U		BY-L/rtg1-L		BY-L/rtg1mks1-L		BY-L/mks1-L		BY-L/rtg2mks1-L		U cells (wt)/L cells (wt)		
Gene	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	Protein
BDH2	5,55	s	5,55	s	5,55	s	4,03	s		NS		NS		NS		NS		NS	Probable diacetyl reductase [(R)-acetoin forming] 2
THI73	5,15	s	7,31	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS	7,31	s	Thiamine pathway transporter THI73
HPT1	2,76	0,002560	1,56	0,008344	1,56	0,011113	1,70	0,008933	6,45	s	1,54	0,007802	1,33	0,001940	0,97	0,022620		NS	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
THI12	2,63	0,000560	1,28	0,003280	3,68	0,000090	5,37	0,002768	6,68	0,016389	2,21	0,005986	10,25	s	10,25	s	1,90	0,010744	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate synthase THI12
ADH2	2,35	0,001922	1,55	0,001304		NS		NS	1,71	0,001058	1,25	0,001298		NS		NS		NS	Alcohol dehydrogenase 2
INO1	1,78	0,010029	1,19	0,024923	2,86	0,001113	2,58	0,003331		NS		NS	2,69	0,004540	2,24	0,008920		NS	Inositol-3-phosphate synthase
REE1	1,74	0,000776	0,95	0,003213		NS		NS		NS		NS	-1,10	0,003731	-0,97	0,000935		NS	Regulation of enolase protein 1
OPI3	0,94	0,003904	1,00	0,002242		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Phosphatidyl-N-methylethanolamine N-methyltransferase
KIN1		NS		NS		NS		NS	6,56	s	6,56	s		NS		NS		NS	Serine/threonine protein kinase KIN1
THI4		NS		NS	1,56	0,004041	1,73	0,001299	1,91	0,016274	1,45	0,009612	3,78	0,001715	3,11	0,000642	1,50	0,014781	Thiamine thiazole synthase
RGI2		NS		NS		NS		NS	1,76	0,002472	0,98	0,009537		NS		NS		NS	Respiratory growth induced protein 2
SSA3		NS		NS		NS		NS	1,63	0,002228	0,81	0,003182		NS		NS		NS	Heat shock protein SSA3
CPS1		NS		NS		NS		NS	1,25	0,002290	0,85	0,001034		NS		NS		NS	Carboxypeptidase S

s	significant (protein detected in one strain but not detected in the other)
ns	non-significant

Table S3-A: Proteins, upregulated in both BY-rtg1 and BY-rtg1mks1 compared with the wt in U- and /or L- cells of alkali-phase colonies

	SAMPLE = U CELLS								SAMPLE = L CELLS										
	BY-U/rtg1-U		BY-U/rtg1mks1-U		BY-U/mks1-U		BY-U/rtg2mks1-U		BY-L/rtg1-L		BY-L/rtg2mks1-L		BY-L/rtg1mks1-L		BY-L/mks1-L		U cells (wt) /L cells (wt)		
Gene	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	Protein
CWP1	-8,46	s	-8,35	s		NS		NS		NS		NS	8,41	s	6,14	s	-8,41	s	Cell wall protein CWP1
MRPL37	-7,08	s	-4,94	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-7,62	s	54S ribosomal protein L37, mitochondrial
TCO89	-6,55	s	-6,23	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Target of rapamycin complex 1 subunit TCO89
MZM1	-6,33	s	-6,27	s	-5,99	s	-4,02	s		NS		NS		NS		NS	-6,42	s	Mitochondrial zinc maintenance protein 1, mitochondrial
PLB2	-6,01	s	-5,93	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Lysophospholipase 2
CTR1	-5,94	s	-6,15	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-6,58	s	Copper transport protein CTR1
YMR134W	-5,74	s	-5,83	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-5,76	s	Uncharacterized protein YMR134W
SSK1	-5,55	s	-8,12	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Osmolarity two-component system protein SSK1
UPF3	-4,98	s	-4,84	s	-4,64	s	-4,77	s		NS		NS		NS		NS		NS	Nonsense-mediated mRNA decay protein 3
REX2	-4,84	s	-5,18	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-5,25	s	Oligoribonuclease, mitochondrial
MRPL44	-4,59	s	-4,68	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	54S ribosomal protein L44, mitochondrial
MRPL20	-4,01	s	-4,13	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-4,18	s	54S ribosomal protein L20, mitochondrial
ALR1	-3,44	s	-2,73	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Magnesium transporter ALR1
SDH6	-3,17	0,012134	-3,37	0,006994		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-3,34	0,006405	Succinate dehydrogenase assembly factor 1, mitochondrial
SMI1	-3,08	s	-3,78	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-5,21	s	Cell wall assembly regulator SMI1
FET3	-2,35	0,000034	-2,50	0,000014		NS		NS		NS		NS	0,98	0,000084	1,03	0,000178	-2,30	0,00001	Iron transport multicopper oxidase FET3
CHZ1	-2,08	0,007906	-2,02	0,001542		NS		NS		NS		NS	0,91	0,022426	0,94	0,004303	-1,28	0,00793	Histone H2A.Z-specific chaperone CHZ1
RPM2	-1,82	0,002641	-2,01	0,001388		NS		NS	-2,24	0,001910	-1,47	0,009209		NS		NS		NS	Ribonuclease P protein component, mitochondrial
HSP150	-1,73	0,007599	-1,66	0,005023		NS		NS	-1,67	0,000017	-1,22	0,000144		NS		NS		NS	Cell wall mannoprotein HSP150
CAF20	-1,56	0,018395	-1,59	0,001361		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,33	0,00803	Cap-associated protein CAF20
TY1B-GR1	-1,55	0,000036	-1,63	0,000533		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,09	0,00032	Transposon Ty1-GR1 Gag-Pol polyprotein
DDR48	-1,52	0,014489	-1,35	0,015250		NS		NS	-1,23	0,004221	-1,15	0,006010		NS		NS		NS	Stress protein DDR48
SKP1	-1,48	0,006156	-1,23	0,000721		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-0,85	0,01066	Suppressor of kinetochore protein 1
OLE1	-1,45	0,013068	-1,92	0,013680		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Acyl-CoA desaturase 1
CPR2	-1,38	0,011726	-0,93	0,008897		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
FSH1	-1,37	0,019867	-1,70	0,005258		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-3,04	0,00076	Family of serine hydrolases 1
MRPS18	-1,23	0,003177	-1,03	0,008696		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,11	0,00641	37S ribosomal protein S18, mitochondrial
FAS2	-1,20	0,000002	-1,11	0,000105		NS		NS		NS		NS	1,00	0,000072	0,93	0,000114	-1,15	0,00003	Fatty acid synthase subunit alpha
FAS1	-1,20	0,000120	-1,17	0,000213		NS		NS		NS		NS	1,05	0,000296	0,99	0,000589	-1,23	0,000183	Fatty acid synthase subunit beta
RSM7	-1,13	0,000298	-0,98	0,000899		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-0,98	0,002125	37S ribosomal protein S7, mitochondrial
RSM28	-1,13	0,024110	-0,81	0,013083		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,49	0,001704	37S ribosomal protein RSM28, mitochondrial
OYE2	-1,11	0,000003	-1,19	0,000039		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-0,87	0,000115	NADPH dehydrogenase 2
ERG5	-1,11	0,000047	-0,91	0,003113		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,07	0,000509	Cytochrome P450 61
CAR1	-1,11	0,000454	-1,00	0,000380		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Arginase
ECM33	-1,09	0,001736	-0,93	0,001371		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-0,87	0,001720	Cell wall protein ECM33
MRPS17	-1,09	0,000374	-0,93	0,000364		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,09	0,000074	37S ribosomal protein S17, mitochondrial
INO1	-1,09	0,000087	-1,26	0,007687	-1,35	0,000373	-0,91	0,000733	1,01	0,000553	0,89	0,000600	2,89	0,000012	2,38	0,000166	-2,77	0,000009	Inositol-3-phosphate synthase
PIC2	-1,09	0,000611	-1,15	0,003633		NS		NS	-1,91	0,000012	-1,56	0,000068	1,04	0,001549	1,15	0,001842		NS	Mitochondrial phosphate carrier protein 2
SAH1	-1,08	0,000012	-1,05	0,000211		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,38	0,000039	Adenosylhomocysteinase
PSP2	-1,07	0,000792	-1,06	0,001207		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,21	0,000257	Protein PSP2
MRP4	-1,05	0,000653	-0,96	0,002907		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-0,99	0,000562	37S ribosomal protein MRP4, mitochondrial
CDC37	-1,05	0,001565	-1,02	0,001069		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Hsp90 co-chaperone Cdc37
MRPS5	-1,05	0,000625	-1,15	0,003377		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,14	0,001152	37S ribosomal protein S5, mitochondrial
GAS1	-1,04	0,004293	-0,98	0,002444		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,00	0,001437	1,3-beta-glucanosyltransferase GAS1
TOM22	-1,03	0,034919	-1,23	0,002321		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,19	0,001481	Mitochondrial import receptor subunit TOM22
HXT6	-1,03	0,016898	-0,96	0,041482	-1,50	0,005052	-1,44	0,005840		NS		NS	1,51	0,000344	1,55	0,000137	-3,83	0,000151	High-affinity hexose transporter HXT6
SCW10	-1,02	0,025829	-0,88	0,017639		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Probable family 17 glucosidase SCW10
PET123	-1,01	0,001214	-0,86	0,000813		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,01	0,000648	37S ribosomal protein PET123, mitochondrial
MRPL8	-1,00	0,000043	-0,82	0,006222		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,44	0,000012	54S ribosomal protein L8, mitochondrial
YPL260W	-0,99	0,000254	-0,93	0,001240		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	UPF0662 protein YPL260W
MRPL4	-0,97	0,008069	-1,02	0,004518		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,10	0,003380	54S ribosomal protein L4, mitochondrial
FBP1	-0,96	0,000750	-1,01	0,000651		NS		NS		NS		NS	1,06	0,000048	1,13	0,000072	-1,51	0,000071	Fructose-1,6-bisphosphatase
RCK2	-0,96	0,001104	-1,07	0,002498	-1,33	0,000352	-0,92	0,012501		NS		NS		NS		NS	-1,97	0,000181	Serine/threonine-protein kinase RCK2
RSM23	-0,95	0,005494	-0,95	0,004667		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,13	0,003101	37S ribosomal protein S23, mitochondrial
MRPL10	-0,95	0,005523	-0,77	0,003268		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,27	0,000646	54S ribosomal protein L10, mitochondrial
MTF2	-0,95	0,009980	-1,23	0,005850		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-0,81	0,014470	Mitochondrial transcription factor 2
ERG1	-0,94	0,002305	-0,77	0,006371		NS		NS		NS		NS	3,29	0,001441	1,06	0,007597		NS	Squalene monooxygenase
YML6	-0,92	0,008061	-1,06	0,003616		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,27	0,001698	54S ribosomal protein YmL6, mitochondrial
MRP17	-0,91	0,002292	-1,01	0,005647		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,23	0,000298	37S ribosomal protein MRP17, mitochondrial
ADH6	-0,89	0,000669	-0,93	0,000317		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,98	0,000063	NADP-dependent alcohol dehydrogenase 6
ATP6	-0,89	0,008636	-0,98	0,001761		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,34	0,002050	ATP synthase subunit a

ACC1	-0,88	0,000015	-0,88	0,000216		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,03	0,000040	Acetyl-CoA carboxylase;Biotin carboxylase
ACS2	-0,86	0,004989	-1,11	0,017858	-1,38	0,001408	-1,17	0,001761		NS		NS	-0,95	0,000008	-0,98	0,000003	-3,24	0,000029	Acetyl-coenzyme A synthetase 2
THI73	-0,85	0,002686	-1,44	0,004020		NS		NS	2,59	0,002440	3,83	s		NS		NS		NS	Thiamine pathway transporter THI73
MRPL9	-0,85	0,000125	-1,00	0,000003		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,39	0,000073	54S ribosomal protein L9, mitochondrial
MRPL13	-0,85	0,000552	-0,93	0,000370		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	54S ribosomal protein L13, mitochondrial
EHT1	-0,85	0,001430	-0,87	0,002949	-1,20	0,000832	-1,11	0,000605		NS		NS		NS		NS	-1,91	0,000102	Medium-chain fatty acid ethyl ester synthase/esterase 2
PNP1	-0,83	0,000442	-0,82	0,000370		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,34	0,000038	Purine nucleoside phosphorylase
AGX1	-0,82	0,000990	-0,88	0,006328	-0,83	0,002141	-0,86	0,000403		NS		NS		NS		NS	-1,45	0,000137	Alanine--glyoxylate aminotransferase 1
IGO1	-0,81	0,011897	-0,92	0,000803		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	mRNA stability protein IGO1
YPL067C	-0,81	0,026385	-0,95	0,009445		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Uncharacterized protein YPL067C
POR1	-0,80	0,000051	-0,81	0,000312		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,43	0,000070	Mitochondrial outer membrane protein porin 1
CDC21	-0,80	0,002091	-0,81	0,004892	-1,06	0,001106	-0,87	0,000313		NS		NS		NS		NS	-1,22	0,000567	Thymidylate synthase
ADH2	-0,79	0,000000	-1,02	0,000358		NS		NS	1,85	0,000008	1,49	0,000023		NS		NS		NS	Alcohol dehydrogenase 2
MRPL22	-0,78	0,005737	-0,87	0,003891		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-0,93	0,003647	54S ribosomal protein L22, mitochondrial
MRPS9	-0,78	0,000223	-0,91	0,002406		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-1,19	0,000348	37S ribosomal protein S9, mitochondrial
ERG6	-0,78	0,000238	-0,81	0,000370		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Sterol 24-C-methyltransferase
YJU3	-0,77	0,008386	-0,80	0,010952		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Monoglyceride lipase
OPI10		NS		NS		NS		NS	-5,99	s	-6,07	s		NS		NS	6,28	s	Protein OPI10
CHA1		NS		NS	-6,74	s	-6,46	s	-3,69	0,001775	-2,70	0,006370		NS		NS	-5,67	s	Catabolic L-serine/threonine dehydratase;L-serine dehydratase;L-threonine dehydratase
POP2		NS		NS		NS		NS	-3,68	s	-5,96	s		NS		NS		NS	Poly(A) ribonuclease POP2
MST1		NS		NS		NS		NS	-3,30	s	-5,04	s		NS		NS		NS	Threonine--tRNA ligase, mitochondrial
GPB2		NS		NS		NS		NS	-3,09	s	-4,30	s		NS		NS		NS	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2
YML087W		NS		NS		NS		NS	-2,67	0,016528	-2,75	0,021086		NS		NS		NS	Probable ADP-ribose 1-phosphate phosphatase YML087W
HAA1		NS		NS		NS		NS	-2,61	0,042813	-2,72	0,032013		NS		NS		NS	Transcriptional activator HAA1
YFL042C		NS		NS		NS		NS	-2,44	0,013365	-2,23	0,020835		NS		NS	2,39	0,022435	Uncharacterized protein YFL042C
YGP1		NS		NS		NS		NS	-1,57	0,001937	-0,95	0,002007	1,24	0,001337	1,35	0,000147		NS	Protein YGP1
UIP4		NS		NS		NS		NS	-1,33	0,004035	-0,99	0,012622		NS		NS		NS	ULP1-interacting protein 4
YPR127W		NS		NS		NS		NS	-1,31	0,000147	-1,16	0,000271		NS		NS	1,33	0,000083	Putative pyridoxal reductase
AIM46		NS		NS		NS		NS	-1,20	0,000455	-0,95	0,002798		NS		NS		NS	Altered inheritance of mitochondria protein 46, mitochondrial
YKL023C-A		NS		NS		NS		NS	-1,15	0,008323	-1,29	0,043024		NS		NS		NS	Uncharacterized protein YKL023C-A
YFR016C		NS		NS		NS		NS	-0,94	0,007528	-0,85	0,003150		NS		NS		NS	Uncharacterized protein YFR016C
YJR008W		NS		NS		NS		NS	-0,87	0,001173	-0,89	0,002200		NS		NS	1,08	0,000493	MEMO1 family protein YJR008W
REG1		NS		NS		NS		NS	-0,87	0,000029	-0,81	0,000042		NS		NS		NS	Resistance to glucose repression protein 1
YMR090W		NS		NS		NS		NS	-0,84	0,002005	-0,86	0,000206		NS		NS	1,77	0,000005	UPF0659 protein YMR090W

s	significant (protein detected in one strain but not detected in the other)
ns	non-significant

Terms from the Process Ontology of gene_association.sgd with p-value <= 0.01

Gene Ontology term	Cluster frequency	Genome frequency	Corrected P-value	FDR	False Positives	Genes annotated to the term
mitochondrial translation	21 of 68 genes, 30.4%	171 of 7166 genes, 2.4%	7,98E-16	0,00%	0	YML6, RSM7, MRPL44, MRPL8, PET123, MRPL22, MRPL37, MRPS17, MRPL4, MRP17, MRPS9, MRPS5, RSM28, MRP4, MTF2, MRPS18, MRPL9, RSM23, MRPL20, MRPL13, MRPL10
mitochondrial gene expression	22 of 68 genes, 31.9%	201 of 7166 genes, 2.8%	1,34E-15	0,00%	0	MRPL10, MRPL13, MRPL20, RSM23, MRPL9, MRPS18, MTF2, MRP4, RSM28, MRPS5, MRP17, MRPS9, RPM2, MRPL4, MRPS17, MRPL37, MRPL22, PET123, MRPL8, MRPL44, RSM7, YML6
translation	23 of 68 genes, 33.3%	767 of 7166 genes, 10.7%	0,0001	0,00%	0	MRPS17, MRPL37, MRPL4, MRPL22, MRPL8, PET123, MRPL44, RSM7, YML6, MRPL20, MRPL10, MRPL13, CAF20, MRPL9, RSM23, MRPS18, MRP4, MTF2, MRPS5, RSM28, RPM2, MRP17, MRPS9
long-chain fatty acid biosynthetic process	3 of 68 genes, 4.3%	4 of 7166 genes, 0.1%	0,00108	0,00%	0	ACC1, FAS1, FAS2

Terms from the Component Ontology of gene_association.sgd with p-value <= 0.01

Gene Ontology term	Cluster frequency	Genome frequency	Corrected P-value	FDR	False Positives	Genes annotated to the term
mitochondrial ribosome	20 of 68 genes, 29.0%	92 of 7166 genes, 1.3%	1,11E-20	0,00%	0	MRPL4, MRPS17, MRPL9, PET123, MRPL37, MRP4, YML6, RSM28, MRPS5, MRPS9, MRPS18, MRP17, RSM7, MRPL13, RSM23, MRPL20, MRPL22, MRPL8, MRPL10, MRPL44
mitochondrial matrix	22 of 68 genes, 31.9%	236 of 7166 genes, 3.3%	1,30E-14	0,00%	0	MRPL20, MRPL22, RPM2, RSM23, MRPL44, MRPL10, MRPL8, MRPS9, MRPS5, MRP17, RSM7, MRPL13, MRPS18, MRP4, MRPL37, YML6, RSM28, MTF2, MRPL4, MRPS17, MRPL9, PET123
mitochondrial small ribosomal subunit	10 of 68 genes, 14.5%	37 of 7166 genes, 0.5%	9,38E-11	0,00%	0	RSM7, MRP17, PET123, MRPS17, MRPS18, MRPS9, MRPS5, RSM28, MRP4, RSM23
mitochondrial large ribosomal subunit	10 of 68 genes, 14.5%	49 of 7166 genes, 0.7%	2,02E-09	0,00%	0	MRPL4, MRPL9, MRPL13, MRPL37, MRPL20, MRPL22, MRPL8, YML6, MRPL44, MRPL10
mitochondrion	36 of 68 genes, 52.2%	1236 of 7166 genes, 17.2%	3,00E-09	0,00%	0	RSM7, MRP17, ATP6, GAS1, MRPL8, PET123, MRPS17, MRPL4, ECM33, FAS2, YIL160C, MRPL37, MRPL13, MRPS18, PIC2, MRPS9, YJU3, MRPS5, MRPL44, MRPL10, FAS1, MRPL22, MRPL20, RSM23, RPM2, MRPL9, MTF2, ACC1, OYE2, RSM28, YML6, TOM22, POR1, REX2, ERG6, MRP4
fatty acid synthase complex	2 of 68 genes, 2.9%	2 of 7166 genes, 0.0%	0,00868	0,00%	0	FAS1, FAS2

Table S3-B: Proteins, upregulated in both BY-rtg1 and BY-rtg1mks1 compared with the wt in upper and/or lower cells of acidic-phase colonies

	SAMPLE = upper CELLS								SAMPLE = lower CELLS								U cells (wt) /L cells (wt)		
	BY-U/rtg1-U		BY-U/rtg1mks1-U		BY-U/mks1-U		BY-U/rtg2mks1-U		BY-L/rtg1-L		BY-L/rtg2mks1-L		BY-L/rtg1mks1-L		BY-L/mks1-L				
Gene	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value	Protein
IMG1	-7,35	s	-4,87	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	54S ribosomal protein IMG1, mitochondrial
HXT7	-7,03	s	-4,63	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-7,21	s	High-affinity hexose transporter HXT6
YIL077C	-6,81	s	-6,68	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Uncharacterized protein YIL077C
LAG2	-6,74	s	-4,68	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 homolog
MIC12	-6,52	s	-4,30	s	-6,57	s	-6,87	s		NS		NS		NS		NS		NS	MICOS complex subunit MIC12
DSD1	-6,25	s	-6,23	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS	-4,10	s	D-serine dehydratase
MGR1	-5,36	s	-3,49	s		NS		NS		NS		NS		NS		NS		NS	Mitochondrial inner membrane i-AAA protease supercomplex subunit MGR1
OST2	-4,49	s	-6,67	s		NS		NS		NS		NS	6,23	s	6,23	s	-6,23	s	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit OST2
PIC2	-1,85	0,002547	-1,65	0,002548		NS		NS	-1,60	0,006948	-1,58	0,001534		NS		NS		NS	Mitochondrial phosphate carrier protein 2
TRM5		NS		NS		NS		NS	-7,19	s	-6,55	s		NS		NS	6,51	s	tRNA (guanine(37)-N1)-methyltransferase
NBA1		NS		NS		NS		NS	-6,42	s	-4,60	s		NS		NS		NS	Protein NBA1
APL5		NS		NS		NS		NS	-6,38	s	-4,07	s		NS		NS		NS	AP-3 complex subunit delta
ARP8		NS		NS		NS		NS	-4,98	s	-6,64	s		NS		NS		NS	Actin-like protein ARP8
YLR290C		NS		NS		NS		NS	-4,72	s	-6,75	s		NS		NS	4,36	s	Uncharacterized protein YLR290C, mitochondrial
COX12		NS		NS		NS		NS	-4,06	s	-6,12	s	-6,27	s	-6,06	s		NS	Cytochrome c oxidase subunit 6B
YKL091C		NS		NS		NS		NS	-3,37	0,029107	-3,16	0,018474		NS		NS		NS	CRAL-TRIO domain-containing protein YKL091C

s	significant (protein detected in one strain but not detected in the other)
ns	non-significant

Terms from the Component Ontology of gene_association.sgd with p-value <= 0.01

Gene Ontology term	Cluster frequency	Genome frequency	Corrected P-value	FDR	False Positives	Genes annotated to the term
mitochondrion	10 of 16 genes, 62.5%	1236 of 7166 genes, 17.2%	0,00309	0,00%	0	YLR290C, YIL077C, LAG2, MIC12, PIC2, MGR1, TRM5, IMG1, HXT7, COX12

Table S4. List of the primers

Primer Name	Primer sequence
ARG1-GFP FW	AAATACGGTGAATCCAAAAAAACCAAAGGTGAAGAGTTGACTTTGGGTGACGGTGCTGGTTTA
ARG1-GFP RV	GGAGGAAGAGATCGTTATCTATCTTGAGGCGATGAACTAGCGGACTCGATGAATTCGAGCTCG
CAT2-GFP FW	ATTTTTGACGCCTTGGAAAATGAGAATAAACGAAAAGCAAAGTTAGGTGACGGTGCTGGTTTA
CAT2-GFP RV	CAAAAATATTCACAAATTAATTGAAGAGGAAAGGTGAAAAATTCATCGATGAATTCGAGCTCG
CIT3-GFP FW	TCTGGAAGCACTTACCAAAGCAAGCAATGTTAACAAGTTGGGTGACGGTGCTGGTTTA
CIT3-GFP RV	TGTAATAGCAAACGAAGCATTCTTGTAAATTGGAACTGCGTCGATGAATTCGAGCTCG
CRC1-GFP FW	TTAGGTGTGGAGATGACTCATTCACTGTTCAAGAAGTATGGCATAGGTGACGGTGCTGGTTTA
CRC1-GFP RV	CCAGAAAAAAAATGGGAGGCAGGTCCACCTAACAAAAATTTAATCATCGATGAATTCGAGCTCG
DLD3-GFP FW	AATCACTACGATCCAAATGGAATCTTAAACCCATACAAGTACATTGGTGACGGTGCTGGTTTA
DLD3-GFP RV	TAAAGAAAAAGGGTTTGCTCTTTGAAAGTTAAAAATTAACAAAGTTCGATGAATTCGAGCTCG
GDH3-GFP FW	TTCGTCATGGTGGCTGACGCAATGCTTGACCAGGGAGACGTTTTTGGTGACGGTGCTGGTTTA
GDH3-GFP RV	CACTACTACATACACAGATAGTTACGAACAAAAAGAAAATAGCGCTTACGGTCGATGAATTCGAGCTCG
LEU1-GFP FW	AGAAAAGCTGTTACAACTACTTTCGATAAAGTCCACCAGGATTGGGGTGACGGTGCTGGTTTA
LEU1-GFP RV	AGACACATGTTATTGACGCCAGGTTTGGACGTTGTTTTTCACTGTTCGATGAATTCGAGCTCG
OAC1-GFP FW	ATGAAACTAGTTTATTCGATAGAGTCGAGAGTTTTAGGCCATAATGGTGACGGTGCTGGTTTA
OAC1-GFP RV	CTGGCCAATGAATGAAACTTCAAACCTCGGAGTTTGTTATGGGAATCGATGAATTCGAGCTCG
PDH1-GFP FW	TTGAATATGCAAATCGACAAATACATGGATTTGTTTACTGAGGGAGGTGACGGTGCTGGTTTA
PDH1-GFP RV	AATTGAAGTAGGTACCATGCCGTTCGCTCTTAAAGAGCCAACCATTCGATGAATTCGAGCTCG
TAH1-GFP FW	CCTGTTGTAGAGGTTGATGAACTACCGGAGGGATACGACCGGTCCGGTGACGGTGCTGGTTTA
TAH1-GFP RV	TATATAATTTTAAAGATAAATTAGAAGTGTTCCCTTTCTCTTTTCTCGATGAATTCGAGCTCG
YAT1-GFP FW	TACCTGTTGTCCGGCTACGATTACTTCGACGTGAGCGTGTCCGGTGGTGACGGTGCTGGTTTA
YAT1-GFP RV	AGTAGTAAAAATAATATTGATGCGCAAAAACTCAGCATAAACTCATCGATGAATTCGAGCTCG
YAT2-GFP FW	TTTGACCGCAGTCGTGTGGGTAGAAAGGTGGCGACCTTAGATCAAGGTGACGGTGCTGGTTTA
YAT2-GFP RV	GCTTACGCATAATGCTAGTAATAAATAGATAAACAAAGAGCGTTCTCGATGAATTCGAGCTCG
RTG1 DEL FW	CAAAAAACACTAGATAGTGAACCAAAAGAAAGCACAACACCAAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
RTG1 DEL RV	ACGAGGGTTATCACAACATAGCAATAGTGAGAGTCAGAAGTACTTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
MKS1 DEL FW	AACACTTCCTAATTATTCTCTAATCCTAATAAAAAAAAAGAACTGCAGCTGAAGCTTCGTACGC
MKS1 DEL RV	TTGAAAGAACTTTAAATACTGTATCTGATTTATTTAACTTAGTAAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG

6. Diskuse

V přírodě se jednobuněčné mikroorganismy zpravidla nacházejí ve formě mnohobuněčných struktur (biofilmů a kolonií), ve kterých probíhá mnoho procesů typických pro mnohobuněčné organismy, jako jsou například diferenciace buněk, buněčná signalizace a regulovaná buněčná smrt (Honigberg, 2011; Váchová a Palková, 2018). Studium těchto struktur a mechanismů stojících za jejich vznikem je důležité z medicínského hlediska, protože tyto struktury často pomáhají mikroorganismům přežívat v nepříznivých podmínkách a odolávat léčbě například antibiotiky (Chandra et al., 2001; Nobile a Johnson, 2015; Ramage et al., 2012; Gulati a Nobile, 2017). Některé poznatky také naznačují, že spuštěné regulace a výměny živin a odpadních látek, ke kterým dochází v diferencovaných kvasinkových koloniích, se nápadně podobají vztahům mezi některými normálními a nádorovými buňkami u savců (Čáp et al., 2012). V našich pracích jsme se zaměřili na dvě oblasti výzkumu, a to na základní mechanismy ovlivňující formování biofilmů a kolonií a na vliv mitochondriální retrográdní signalizace na vývoj hladkých kolonií *S. cerevisiae*.

6.1 Mechanismy ovlivňující vývoj mnohobuněčných struktur

Vývoj kvasinkového biofilmu probíhá v několik krocích (kapitola 3.2). V naší práci jsme se zaměřili především na inicializaci tvorby biofilmů při adhezi kvasinkových buněk k plastu (v tomto případě polystyrenu) (Van Nguyen et al., 2020). U některých kmenů *S. cerevisiae* byla tato schopnost popsána už dříve (Reynolds a Fink, 2001; Bojsen et al., 2014). V naší práci jsme ukázali, že divoký kmen BR-F, tvořící strukturované (biofilmové) kolonie, dokáže adherovat k polystyrenu a tvořit SLI biofilm (na rozhraní pevná látka – kapalina). Pokud u tohoto divokého kmene dojde k přepnutí fenotypu (BR-S), neboli domestikaci (viz kapitolu 3.3.1.1), kdy začne tvořit hladké kolonie, ztrácí tento kmen schopnost adheze. Totéž, co pro kmen BR-S, platí i pro laboratorní kmen BY4742, který tvoří stabilně hladké kolonie při růstu na agaru. Adheze buněk kmene BR-F je navíc závislá na přítomnosti glukózy, kdy v její nepřítomnosti k adhezi dochází, a v přítomnosti nedochází.

6.1.1 Tvorba SLI biofilmu na polystyrenu a jeho regulace

V naší práci jsme ukázali, že adheze k pevnému povrchu na rozhraní s kapalinou a následná tvorba biofilmu jsou spojeny s expresí Flo11p, která je regulována pomocí Tup1p a Cyc8p (kapitola 3.4.1) Pro regulaci změny exprese regulátoru jsme jako experimentální model použili modifikované kmeny, kde vždy jedna alela regulátoru (*TUP1*/*CYC8*) byla deletovaná a druhá pod indukovatelným

promotorem. Použili jsme tento systém, protože delece *cyc*8 není životaschopná (Van Nguyen et al., 2018), ale minimální exprese Cyc8p bez indukce stačí k přežití kmene. V případě *TUP1* se kmen s indukčním promotorem bez indukce choval při adhezi podobně jako čistá delece *tup1*. Takto upravené kmeny jsme využili k modulaci exprese daných regulátorů. Jako induktor jsme použili galaktózu, která u rodičovského kmene nemá vliv na adhezi buněk v podmínkách našeho experimentu.

Zjistili jsme, že adheze buněk BR-F, exprese Flo11p a tvorba biofilmu je striktně závislá na výživových podmínkách. Výsledky tedy ukazují, že adheze buněk rodičovského kmene je přímo závislá na růstových podmínkách, a je tudíž vysoká při absenci glukózy a nízká za její přítomnosti. V našem biofilmovém modelu je přítomnost Tup1p nezbytná pro adhezi za nepřítomnosti glukózy, v její přítomnosti však Tup1p adhezi nespouští a biofilm se netvoří. Při použití indukčního promotoru pouze v nepřítomnosti glukózy dochází k adhezi buněk, expresi Flo11p-GFP a tvorbě biofilmu při indukované expresi Tup1p. Za ostatních podmínek, tedy neindukovaný Tup1p v přítomnosti i nepřítomnosti glukózy a indukovaný v přítomnosti glukózy, dochází ke ztrátě adheze a kmen netvoří biofilm. Naproti tomu za minimální exprese Cyc8p (neindukovaný) dochází k vysoké adhezi buněk, expresi Flo11p-GFP a tvorbě biofilmu. Indukce exprese Cyc8p potlačuje adhezi buněk jak v nepřítomnosti, tak v přítomnosti glukózy. Tyto výsledky poukázaly na důležitou roli Cyc8p při tvorbě biofilmu a také na důležitou roli glukózy při regulaci jeho tvorby. V našich pokusech produkce Flo11p-GFP korelovala se schopností kmene adherovat a tvořit biofilm. Z našich dat vyplývá, že Tup1p je klíčovým aktivátorem adheze za nepřítomnosti glukózy a že zvýšená hladina Cyc8p má silný účinek za přítomnosti glukózy a působí proti funkci Tup1p a Flo11p, potenciálně prostřednictvím nedávno popsaných mechanismů (Van Nguyen et al., 2018)

Zaměřili jsme se také na to, zda je rozdíl ve schopnosti adherovat mezi planktonními buňkami ze třepané kultury a statickými buňkami z biofilmu. Regulace Tup1p a Cyc8p funguje podobně pro oba typy buněk a je jen mírně ovlivněná fází růstu buněčné kultury. Rozdílem mezi těmito typy buněk je, že planktonní buňky adherují lépe než buňky ze statické kultury.

Díky nové metodě fixace vzorků pomocí agarózy jsme byli schopni připravit tenké řezy bočního profilu nárůstu buněk v mikrotitračních destičkách a v nativním stavu mikroskopicky pozorovat diferenciaci jednotlivých vzorků. Zjistili jsme, že vývoj struktur biofilmu probíhá hlavně v prvních 24 hodinách a v pozdějších časech se struktury už výrazněji viditelně nevyvíjejí.

Pro lepší pochopení vlivu glukózy na regulaci Tup1p-Cyc8p jsme pozorovali mikroskopické řezy kmenů Tup1p-GFP a Cyc8p-GFP. Oba tyto značené regulátory, jak v přítomnosti, tak při absenci glukózy, lokalizují v jádrech buněk. Úroveň signálu Tup1p-GFP, v neadherovaných buňkách za přítomnosti glukózy a v biofilmu v GM médiu, byla podobná, což ukazuje, že glukóza nemá přímý vliv

na změnu exprese Tup1p. Naproti tomu exprese Cyc8p-GFP je v biofilmu v nepřítomnosti glukózy výrazně nižší než u neadherovaných buněk v médiu za přítomnosti glukózy. Zároveň za přítomnosti glukózy dochází k vyšší expresi Cyc8p-GFP v povrchové části vrstev neadherovaných buněk.

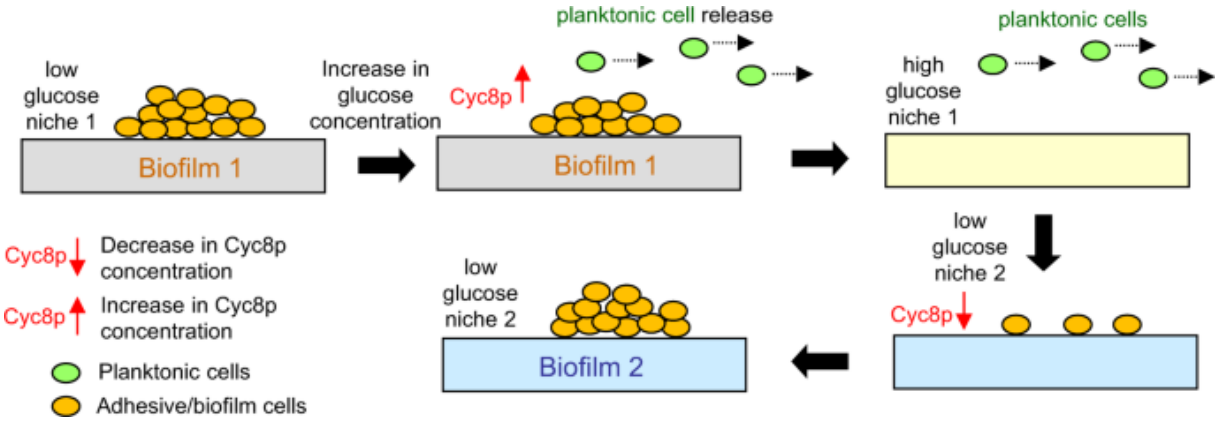
Naše data ukazují, že glukóza reguluje hladinu Cyc8p. V literatuře je popsáno několik různých faktorů, jako jsou Nrg1p, Mig1p a Sfl1p, které se podílejí na regulaci glukózou a ovlivňují funkci Cyc8p a Tup1p, avšak v těchto případech dochází k vazbě koregulátorů přímo na komplex Cyc8p-Tup1p (Wilson et al., 1996; Conlan a Tzamarias, 2001; Verstrepen a Klis, 2006), avšak nebylo prokázáno, že by se tyto koregulátory podílely na protichůdné regulaci Cyc8p a Tup1p (Van Nguyen et al., 2018). Dále je také důležité naše zjištění, že přidání glukózy má za následek uvolňování buněk z biofilmu, což by mohlo hrát významnou roli při kvasinkových systémových a biofilmových infekcích.

Navrhli jsme model vývoje a šíření biofilmů *S. cerevisiae*, kdy při kolonizaci nového prostředí s nízkým obsahem glukózy v okolí je aktivita Cyc8p malá, což napomáhá adhezi a vývoji biofilmů pomocí Tup1p. Pokud se však v okolí zvýší koncentrace glukózy, dochází ke zvýšení exprese Cyc8p, což snižuje adhezi buněk a umožňuje jim oddělit se od biofilmu. Takto uvolněné planktonní buňky se následně mohou rozptýlit a hledat nové vhodné prostředí s nízkou hladinou glukózy, kde začnou tvořit nový biofilm (Obrázek 32). Pomocí tohoto modelu by se kvasinky byly schopné šířit a přežívat v heterogenním prostředí, jakým může být například lidský organismus. Jelikož i malá koncentrace glukózy (0,1 % což je asi 5,5 mM) stačí k uvolňování biofilmů za našich experimentálních podmínek, mohl by tento model být funkční i za fyziologických podmínek (koncentrace glukózy v krvi je nižší než 7,8 mM, 2 h postprandiálně) (Wile a Wilding, 2014). Bylo prokázáno, že kromě pacientů s omezenou imunitou, jsou diabetici další skupinou s vysokým rizikem invazivních houbových infekcí, a u těchto pacientů byly také zaznamenány případy nákazy *S. cerevisiae.* A také bylo zjištěno, že zvýšená koncentrace glukózy v krvi má za následek sníženou účinnost antimykotik při léčbě infekcí způsobených *Candida* spp. (Mandal et al., 2014; Rodrigues et al., 2019). A je důležité si uvědomit, že i kvasinky rodu *Saccharomyces* jsou stále častěji uváděny jako původci invazivních onemocnění (Enache-Angoulvant a Hennequin, 2005; Pillai et al., 2014).

Flo11p je klíčovým proteinem nezbytným pro tvorbu biofilmových struktur, který ovlivňuje většinu procesů potřebných při formování těchto struktur (kapitola 3.3.2) (Šťovíček et al., 2010; Vopálenská et al., 2010; Voordeckers et al., 2012).

Na kmeni BR-F *S. cerevisiae* bylo ukázáno, že regulační faktory Cyc8p a Tup1p fungují protichůdně při regulaci tvorby biofilmových kolonií, kdy Tup1p je nezbytný pro tvorbu strukturované kolonie a Cyc8p tomu brání, přičemž při jeho zvýšené expresi dochází ke tvorbě hladkých kolonií. Bylo též ukázáno, že Tup1p a Cyc8p regulují Flo11p v různých fázích jeho exprese. Cyc8p sám o sobě funguje jako negativní transkripční faktor, který reprimuje produkci Flo11p. Tup1p působí proti funkci

Cyc8p tím, že se s ním váže do komplexu, čímž zabraňuje Cyc8p v represi Flo11p, a Tup1p proto nepřímo funguje jako pozitivní regulátor pro Flo11p. Komplex Cyc8p-Tup1p se pravděpodobně nepodílí na regulaci tvorby biofilmových struktur (Van Nguyen et al., 2018) avšak může regulovat jiné buněčné pochody, jako například tvorbu floků (Fleming et al., 2014; Van Nguyen et al., 2018). Tup1p má pravděpodobně ještě jednu úlohu, a to že zabraňuje degradaci Flo11p, nejspíše pomocí represe nějaké Flo11p specifické proteázy (Van Nguyen et al., 2018).



Obrázek 32: Model vzniku a šíření kvasinkového biofilmu a vlivu glukózy a Cyc8p na jeho další šíření (Van Nguyen et al., 2020).

Regulátory Cyc8p-Tup1p však u *S. cerevisiae* nehrají roli pouze při tvorbě struktur uchycených k pevnému podkladu, když regulují Flo11p, ale také při tvorbě floků, kde hrají hlavní roli flokuliny Flo1p a Flo10p (Verstrepen a Klis, 2006). Oproti situaci u biofilmů a biofilmových kolonií, delece *cyc8* i *tup1* způsobuje zvýšenou flokulaci i za podmínek, kdy ke tvorbě floků nedochází (Van Nguyen et al., 2018).

Při regulaci tvorby floků Cyc8p a Tup1p tvoří komplex, který se skládá ze čtyř molekul Tup1p a jedné molekuly Cyc8p (Varanasi et al., 1996; Smith a Johnson, 2000). Podle navrženého modelu by vazba komplexu Cyc8p-Tup1p do promotorové oblasti genu *FLO1* vedla k umístění nukleosomů a deacetylaci histonů pomocí histon deacetyláz HDAC (Hda1p a Rpd3p), což by vedlo k represi genu *FLO1* (Fleming et al., 2014).

Důležité je, že v našem modelovém kmeni BR-F byly prokázány oba typy regulace, jak tedy antagonická regulace Cyc8p a Tup1p při regulaci vývoje strukturovaných mnohobuněčných struktur, tak represní regulace flokulace komplexem Cyc8p-Tup1p (Van Nguyen et al., 2018). V našem modelu adheze a vývoje SLI biofilmů jsme pozorovali pouze vliv antagonická regulace.

Ortology Tup1p i Cyc8p jsou přítomny u různých druhů kvasinek a jiných hub, avšak jejich úloha ve filamentaci, fenotypovém přepínání a virulenci kvasinkových/houbových patogenů se velice liší u jednotlivých kmenů (Váchová a Palková, 2019). Například u *C. albicans* delece *tup1* vede ke

zvýšené filamentaci a invazivnímu růstu (Braun a Johnson, 1997; García-Sánchez et al., 2005; Su et al., 2018), *SSN6* (ortolog *CYC8*) u *C. albicans* pravděpodobně hraje roli represoru fenotypového přepínání (García-Sánchez et al., 2005). Naproti tomu u další patogenní kvasinky, *Cryptococcus neoformans,* je Tup1p potřebný pro tvorbu dikaryotických hyf a virulenci (Lee et al., 2009).

Komplex Cyc8p-Tup1p tedy hraje důležitou pleiotropickou roli při tvorbě mnohobuněčných struktur u různých druhů kvasinek. U *S. cerevisiae* by regulace komplexu Cyc8p-Tup1p mohla hrát důležitou roli při systémových infekcích, i když jsou v současnosti nemoci způsobené *S. cerevisiae* relativně vzácné.

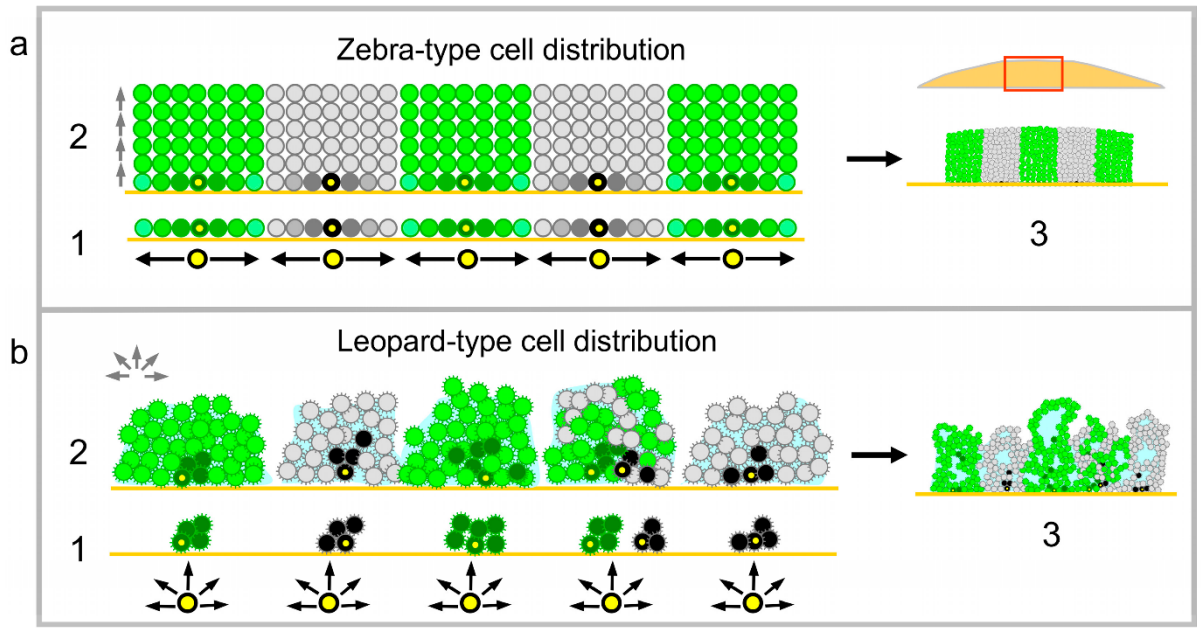
6.1.2 Odlišnosti vývoje mnohobuněčné struktury určující tvorbu hladké versus strukturované (biofilmové) kolonie

Kromě studia vývoje SLI biofilmů jsme se zaměřili i na časné fáze vývoje strukturovaných (biofilmových) a hladkých kolonií (Plocek et al., 2020). Více o rozdílech mezi strukturovanými a hladkými koloniemi a fenotypovém přepínáním mezi nimi v kapitole 3.3.1.1. Naším cílem bylo zjistit, v čem se liší časný vývoj těchto dvou typů kolonií.

Při studiu mechanismů vývoje kolonií na glycerolovém médiu jsme jako model použili chimérické obří kolonie divokého kmene BR-F, tvořícího strukturované kolonie (typ panter), a laboratorního kmene BY4742, tvořícího hladké kolonie (typ zebra). Buněčná suspenze, ze které kolonie vznikaly, byla směsí neznačených buněk a buněk produkujících cytosolické GFP pod konstitutivním promotorem. Značení pomocí GFP nemělo vliv na rychlost růstu jednotlivých kmenů, neboť zastoupení značených a neznačených buněk v koloniích bylo podobné a neměnilo se v čase. Pokud by exprese GFP měla negativní vliv na rychlost růstu, docházelo by v kolonii k převaze neznačených buněk a tato disproporce by se v čase zvyšovala (Maršíková et al., 2020).

V hladkých koloniích typu zebra nejprve rostou buňky v horizontálním směru do volného prostoru v inokulační oblasti a tvoří buněčnou monovrstvu. Ve chvíli, kdy dojde k zaplnění volného prostoru, dochází k růstu kolonie do výšky, popřípadě do okolního prostoru. V centru kolonie se díky tomu vytvářejí relativně pravidelné sloupce značených a neznačených buněk, které jsou na vertikálních řezech kolonie pozorovatelné jako pruhy. Šířka jednotlivých sloupců, vznikajících z jednoho buněčného předka, je závislá na hustotě suspenze během inokulace a platí, že menší hustota inokula vede k širším sloupcům (*Obrázek 33*). V chimérických koloniích v pozdějších fázích vývoje dochází k amoniakové signalizaci a diferenciaci na U a L buňky (Čáp et al., 2012), kdy nejsou rozdíly mezi sloupci tvořenými značenými a neznačenými buňkami. Diferenciace je tedy závislá na poloze buněk, kdy v horní části kolonie vznikají U buňky nezávisle na původu buněk

Na příčných řezech hladkých kolonií vypěstovaných z buněk označených barvivem AlexaFluor488 5-TFP jsme také ukázali, že chronologicky nejstarší buňky v kolonii jsou soustředěny povětšinou v její dolní části blíže agaru (ojediněle jsou některé označené buňky vytlačené do horních části kolonie) a k přirůstání nových buněk dochází směrem nahoru, dále od zdroje živin. Soustředění chronologicky mladších buněk v horní části kolonie by bylo v souladu s předchozími výsledky týkajícími se lokalizace dělících se buněk v horní části kolonie (Čáp et al., 2012).



Obrázek 33: Model distribuce buněk v koloniích typu zebra (A) a panter (B) (Plocek et al., 2020).

Ve strukturovaných koloniích typu panter je vývoj kolonie odlišný od typu zebra. Buňky zůstávají navzájem spojeny a vytvářejí malé trojrozměrné mikrokolonie, které se skládají buď z potomků jednoho předka (obsahují pouze značené, nebo neznačené buňky), nebo několika předků, kteří byli ve velmi těsné blízkosti (potom vzniká mikrokolonie z obou typů buněk). Po čtyřech hodinách vývoje dochází k diferenciaci buněk, objevují se pseudohyfy, které pomáhají v rozšiřování do prostoru a k uchycení a zarůstání mikrokolonií do agaru. Mikrokolonie se následně rozrůstají do všech směrů a dochází k jejich spojení do jedné obří biofilmové kolonie, která má v důsledku nepravidelnou distribuci značených a neznačených buněk. Vzdušné vrásy obří kolonie jsou pak tvořeny nejen shluky značených nebo neznačených buněk, ale také oblastmi s rovnoměrným zastoupení obou typů (*Obrázek 33*).

Na příčných řezech biofilmových kolonií vypěstovaných z buněk označených barvivem AlexaFluor488 5-TFP je vidět, že většina označených buněk zůstává v dolní části u agaru. Značné množství obarvených buněk je však ve shlucích distribuováno ve vráskách v horních částech kolonie,

což ukazuje, že na rozdíl od kolonií typu zebra v koloniích typu panter dochází k migraci větších shluků starších buněk do horní části kolonie, čemuž pravděpodobně pomáhá adheze buněk a ECM, která napomáhá tvoření vrásek.

Kmeny BY4742 a BR-F se liší v klíčových vlastnostech, jako jsou například buněčná adhezivita, tvorba shluků a polarita pučení. Zjišťovali jsme, zda některý z těchto parametrů je zodpovědný za změnu distribuce buněk v koloniích typu zebra a panter typu kolonií.

Delece genů *BUD2* a *RSR1 (BUD1)*, které se podílejí na řízení polarity buněčného dělení (Park et al., 1993; Park et al., 1997), nemají vliv na distribuci buněk v koloniích obou typů. To by odpovídalo dřívějším poznatkům, které nesvědčí, že by změna polarity růstu měla významný vliv na morfologii kolonií (Vopálenská et al., 2005).

U distribuce typu zebra kmene BY4742 jsme připravili deleci *ACE2* genu, která má za následek defekt v oddělování buněk a tvorbu buněčných shluků v důsledku špatného oddělení dceřiných buněk (Bidlingmaier et al., 2001). Ace2p je transkripčním aktivátorem pro chitinázu Cts1p, na které je závislé správné oddělování dceřiných buněk (Dohrmann et al., 1992). V důsledku tvorby shluků došlo sice k menší změně ve sloupcích, které byly širší a měly roztřepené okraje oproti rodičovskému kmeni, ale nedošlo ke změně distribuce z typu zebra na panter typ.

Naproti tomu u distribuce typu panter kmene BR-F delece adhezinu *flo11*, který je klíčovým proteinem potřebným pro tvorbu biofilmových kvasinkových útvarů a adhezi k povrchům, buněčnou adhezi a tvorbu ECM (Reynolds a Fink, 2001; Šťovíček et al., 2010; Voordeckers et al., 2012; Vopálenská et al., 2010; Bojsen et al., 2014), má za následek změnu distribuce na typ zebra.

Předchozí výsledky ukázaly, že při vývoji obří strukturované kolonie haploidního kmene ΣS^h se v raných fázích vývoje kolonie nachází Flo11p ve zvýšené míře v oblastech kontaktů buněk v buněčných shlucích. U shluků dochází k první dimorfické změně růstu na unipolární typ pučení, pravděpodobně vlivem amoniakové signalizace, čímž nastává směrový růst k okolním shlukům. Tento krok je však na Flo11p nezávislý a probíhá i u kmene s delecí *flo11*. Během druhé dimorfické změny dochází k tvorbě pseudohyf a při tomto kroku je Flo11p nezbytný – bez tohoto proteinu nedochází k vytváření vzdušných struktur kolonie a zarůstání buněk do média (Vopálenská et al., 2010). Další studie identifikovala v místech kontaktu mezi buňkami v kmeni BR-F dlouhá vlákna tvořící struktury podobné suchému zipu. Na jejich vzniku se pravděpodobně podílí také Flo11p, jelikož delece *flo11* způsobuje ztrátu těchto struktur. Zároveň na tvorbu těchto struktur mají vliv regulace pomocí Cyc8p a Tup1p, kdy delece *tup1*, popřípadě kontinuální exprese *tefCYC8* mají podobný efekt na tvorbu těchto vláken jako delece *flo11* (Van Nguyen et al., 2018).

Naše výsledky ukazují, že vlastnosti související s buněčnou stěnou, adhezí buněk a tvorbou ECM jsou klíčovými parametry potřebnými pro tvorbu strukturovaných kolonií typu panter a že ztráta

těchto vlastností během domestikace kvasinek má za následek i změnu distribuce buněk na typ zebra. Tyto výsledky jsou v kontrastu s poznatky o zapojení defektů v buněčném dělení, jako je například delece *ace2* a následná tvorba shluků („snowflakes“), v roli možných mechanismů, které se podílejí na tvorbě mnohobuněčných struktur v tekutých médiích. Delece *ace2* způsobuje, že dceřiné buňky zůstávají připojené k mateřské buňce, což vytváří shluky, které mohou mít sklon k mnohobuněčné adaptaci. Shluky se rozmnožují a vytvářejí potomstvo pomocí fragmentace, kdy kvůli překročení pevnosti v tahu dochází k oddělení klastru buněk v jednom spojení mezi buňkami. To má za následek, že oddělený klastr prochází jednobuněčným genetickým efektem hrdla láhve, což může snižovat genetický konflikt uvnitř skupiny buněk, který by mohl narušovat mnohobuněčnou komplexitu. Klastry stejného klonu jsou fyziologicky podobné a to minimalizuje jejich variabilitu a zvyšuje dědičnost mnohobuněčných znaků, což by znamenalo, že selekce na úrovní klastrů by mohla způsobovat jejich rychlou evoluci (Ratcliff et al., 2015). Je pravděpodobné, že pro tvorbu strukturovaných kolonií jsou shluky buněk vytvořené v důsledku delece *ace2* příliš rigidní. Naproti tomu buněčná adheze pomocí Flo11p asi umožňuje lepší reorganizaci buněčných klastrů během vývoje kolonie. Čemuž by odpovídaly i struktury v chimérických koloniích, které vznikají ze značených a neznačených buněk.

6.2 Vliv mitochondriální retrográdní signalizace na vývoj hladkých kolonií

Během vývoje hladké kvasinkové kolonie kmene BY4742 na GM médiu dochází k diferenciaci na dvě buněčné subpopulace U a L, které se mimo jiné liší v morfologii a fyziologii mitochondrií (Čáp et al., 2012; Čáp et al., 2015) (Více v kapitole 3.3.3). V našich výsledcích jsme ukázali, že klíčovou roli ve vývoji kolonie a její diferenciaci hraje mitochondriální retrográdní dráha (RTG) (Podholová et al., 2016). Zároveň jsme zaměřili na identifikaci nových cílových genů RTG dráhy (Plocek et al., 2021).

6.2.1 Tři větve RTG dráhy a jejich aktivita v buněčných subpopulacích kolonie

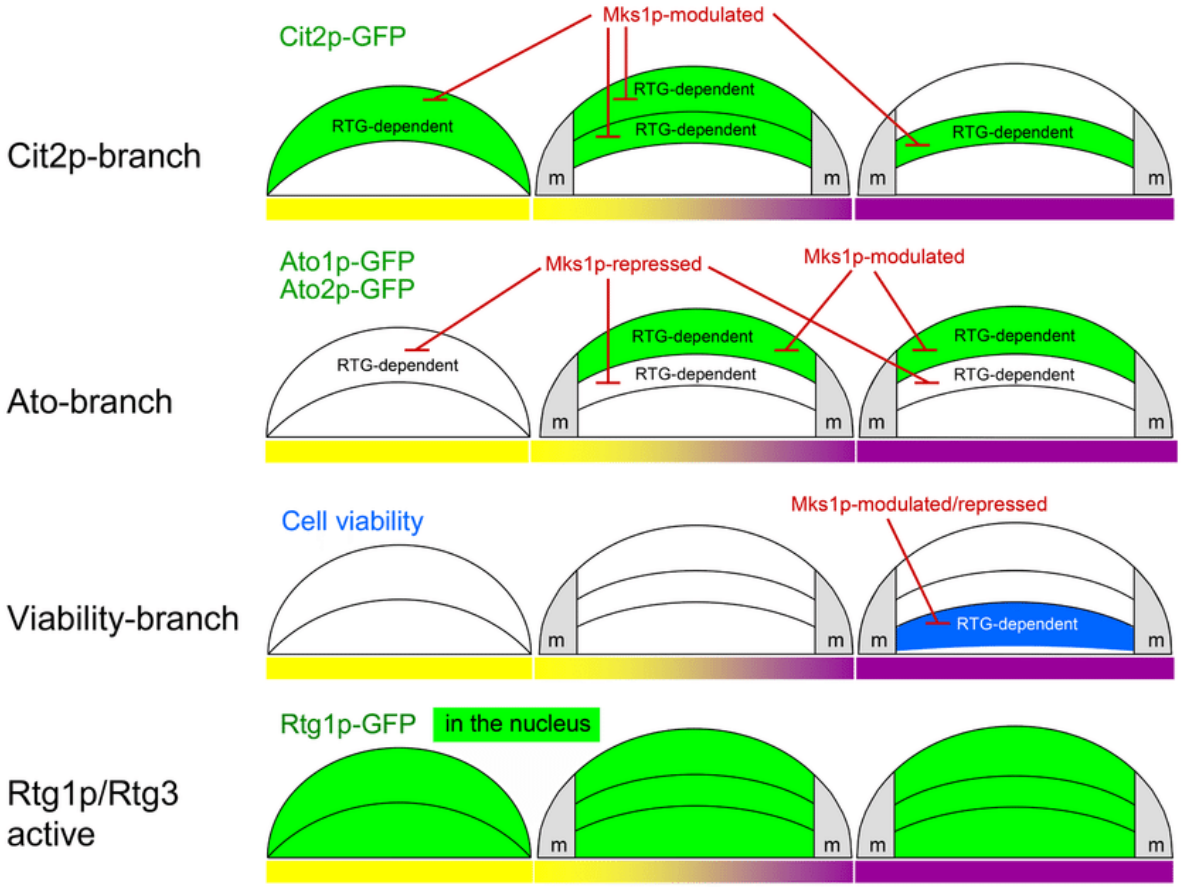
RTG dráha je aktivní ve všech buňkách kolonie v acidické i alkalické fázi růstu, což jsme zjistili pomocí Rtg1p-GFP. V jednotlivých buněčných subpopulacích však dochází k rozdílné regulaci cílových genů a liší se také role RTG dráhy v těchto subpopulacích. První výsledky ukázaly, že během vývoje kvasinkové kolonie můžeme v alkalické kolonii rozlišit tři rozdílné populace buněk, ve kterých se regulace RTG dráhy liší a může mít i vliv na jejich přežívání. Jedná se o U buňky, horní L buňky a spodní L buňky. V každé daných subpopulací je RTG dráha regulována klasickým způsobem, kdy potřebuje pro své fungování aktivátory Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p a represor Mks1p. Tyto regulátory však v

jednotlivých subpopulacích regulují odlišné genové cíle. Tyto tři větve RTG dráhy jsou Ato-větev, Cit2-větev a „viability“ větev, zodpovědná za přežívání buněk (*Obrázek 34*).

Delece hlavních transkripčních faktorů *rtg1* a *rtg3* vykazovaly v zásadě stejný efekt v Ato- a Cit2-větvích regulace, a to vypnutí RTG regulace. Delece *rtg2* má stejný efekt vypnutí RTG dráhy jako delece *rtg1/3*. Důležitá je pak pozice negativního regulátoru MKS1 k pozitivnímu regulátoru RTG2 v RTG dráze. Pomocí vícenásobných delecí *RTG* genů s *MKS1* jsme potvrdili, že *RTG2* funguje upstream od *MKS1* ve všech třech větvích RTG dráhy (Liu a Butow, 2006; Jazwinski, 2014). To znamená, dvojitá delece *rtg2* a *mks1* má na fungování RTG regulace stejný efekt jako delece samotného *mks1*. Vliv dalších negativních regulátorů Bmh1p a Bmh2p nebyl v našem modelu prokázán. Tyto dva regulátory jsou navzájem zastupitelné. Avšak delece obou z nich je u většiny kmenů letální (Van Heusden et al., 1995; Liu et al., 2003; Bruckmann et al., 2007). Životaschopné jsou obě delece na pozadí kmene Σ1278b (Roberts et al., 1997). V našich kmenech se nám nepodařilo vytvořit dvojitou deleci *bmh1/2,* a tedy prozkoumat vliv těchto regulátorů na jednotlivé větve RTG regulace.

V U buňkách jsme identifikovali Ato1p (Ady2p) a Ato2p jako cíle Ato-větve RTG dráhy. Tyto dva proteiny spolu s Ato3p, který není RTG dráhou ovlivněn, jsou indukovány při přechodu z alkalické do acidické fáze růstu a jejich exprese je typická pro U buňky rodičovského kmene (Čáp et al., 2012). Ato3p byl již dříve identifikován během výzkumu kmenů s respirační deficiencí a bylo zjištěno, že jeho exprese je regulována z mitochondrií pomocí jiné retrográdní dráhy, nezávislé na RTG (Guaragnella a Butow, 2003). Avšak některé výsledky ukazují na regulaci tohoto genu pomocí RTG dráhy (Chow et al., 2019). V citované práci autoři pracovali se kmeny odvozenými od Σ1278b, což by mohlo znamenat, že v jiném genetickém pozadí by mohl být *ATO3* regulován pomocí RTG dráhy anebo – jelikož autoři porovnávali pouze změny mezi strukturovanou kolonií rodičovského kmene a hladkou kolonií s delecí *rtg3* – že v hladké kolonii mohlo dojít ke zvýšené expresi Ato3p oproti rodičovskému kmeni i nezávisle na RTG dráze. V koloniích *rtg3* Σ1278b došlo zároveň i ke zvýšené expresi ostatních *ATO* proteinů (Chow et al., 2019). V hladkých koloniích BY4742 dochází k výraznému zvýšení exprese všech Ato proteinů při přechodu z acidické do alkalické fáze růstu a tyto proteiny jsou typické pro U buňky diferencované kolonie (Palková et al., 2002; Čáp et al., 2012). Tato zjištění by mohla naznačovat, že v tomto experimentu (Chow et al., 2019) by mohla být zvýšená exprese Ato3p způsobena tím, že u zkoumaných hladkých kolonií Σ1278b mohlo dojít k diferenciaci, což by mohlo

vést ke zvýšení exprese Ato3p nezávisle na regulaci RTG dráhou.



Obrázek 34: Schematické znázornění regulace jednotlivých větví RTG dráhy a aktivního Rtg1p v jádrech buněk (Podholová et al., 2016).

V Ato-větvi během acidické fáze růstu jsou za normálních podmínek Ato1/2p reprimovány. Ovšem při deleci *mks1* dochází k odblokování jejich represe a ke spuštění jejich produkce v horní části acidické kolonie. V alkalické fázi, kdy jsou Ato1/2p produkovány U buňkami kolonie, je jejich exprese spuštěna pomocí RTG dráhy a delece *rtg1/2/3* zastavuje jejich produkci. Zároveň je exprese Ato1/2p proteinů negativně modulována pomocí Mks1p, kdy delece *mks1* má za následek zvýšení množství Ato1/2p proteinů jak v U buňkách, tak i v horních L buňkách, kde v rodičovském kmeni nejsou exprimovány (*Obrázek 34*).

Typickým cílem RTG dráhy je podle předchozích studií Cit2p (Liu a Butow, 1999; Liu a Butow, 2006), který je markerem pro Cit2-větev RTG regulace. I když je v našem modelu hladké kolonie RTG dráha aktivní ve všech buňkách kolonie, dochází k expresi Cit2p pouze v určitých částech kolonie. V acidické fázi růstu dochází k jeho expresi v horní části kolonie, kdy je jeho produkce regulována klasicky pomocí RTG dráhy, tedy pozitivně pomocí Rtg1/2/3p a negativně skrze Mks1p. Při přechodu do alkalické fáze růstu a diferenciaci kolonie dochází ke změně lokalizace. V horních U buňkách je

Cit2p degradován a jeho syntéza zastavena. Tato represe je přitom nezávislá na Mks1p regulátoru, kdy jeho delece nemá vliv na zastavení exprese Cit2p v U buňkách. K produkci Cit2p dochází pouze v horní části L buněk, kde je normálně regulovaný RTG dráhou, tedy pozitivně pomocí Rtg1/2/3p a negativně skrze Mks1p (*Obrázek 34*).

Třetí větev, zvaná „viability", je odpovědná za přežívání buněk, má vliv na přežívání dolních L buněk v alkalické fázi růstu kolonie. Při přerušení RTG dráhy dochází ke zvýšenému úmrtí buněk v této části kolonie, což ale nemá vliv na produkci Ato a Cit2 proteinů (*Obrázek 34*).

Díky těmto zjištěním o regulaci RTG dráhy můžeme v hladké kolonii kmene BY4742 v acidické fázi definovat dvě subpopulace buněk. Jednou je horní část kolonie, ve které probíhá exprese Cit2p pomocí RTG regulace a nedochází zde k produkci Ato1/2p. Druhou subpopulací je dolní část kolonie, kde nedochází k produkci Cit2p ani Ato1/2p, i když je RTG dráha v těchto buňkách aktivní.

V alkalické kolonii můžeme rozlišit tři subpopulace v závislosti na RTG regulaci. První je U vrstva buněk, kde dochází k expresi Ato1/2p, ale kde je zastavena exprese Cit2p. L vrstvu buněk pak můžeme rozdělit na horní část (druhá subpopulace), kde probíhá exprese Cit2p, a dolní část (třetí subpopulace), kde neprobíhá exprese Cit2p ani Ato1/2p, ale přežívání buněk v této části je závislé na funkční RTG dráze (*Obrázek 34*).

Na regulaci jednotlivých větví RTG dráhy se pravděpodobně podílejí další, nám zatím neznámé modulátory. K tomu závěru nás vede například regulace pomocí Mks1p, která je aktivní jak v Ato-, tak Cit2- větvi, a tedy v diferencované kolonii jak v U buňkách tak v horních L buňkách. Exprese Ato proteinů je reprimována jak v U buňkách, tak v horních L buňkách a delece *mks1* spouští expresi Ato proteinů v obou oblastech. Obráceně to ovšem nefunguje a exprese Cit2p při deleci *mks1* není spuštěná v U buňkách, ale pouze v horních L buňkách. Přitom v horní části acidické kolonie dochází k regulaci jak Ato, tak Cit2p proteinů zároveň a delece *mks1* zvyšuje expresi všech těchto cílových genů RTG dráhy.

Zajímavé je spojení fyziologie mitochondrií v různých částech diferencované alkalické kolonie s různou regulací RTG dráhy. U buňky mají velké mitochondrie s redukovanými kristami se sníženou respirační kapacitou, zatímco L buňky mají menší dobře vyvinuté mitochondrie s vyšší respirační kapacitou (Čáp et al., 2012). V U buňkách snížená funkčnost mitochondrií pravděpodobně aktivuje RTG dráhu přes Rtg2p i přesto, že tyto buňky jsou metabolicky aktivní, mají vysoké množství glutaminu/glutamátu a aktivní TOR dráhu (Čáp et al., 2012; Váchová et al., 2013), což jsou podmínky, za kterých je RTG dráha v tekutých kulturách inhibována (Komeili et al., 2000; Liu et al., 2001). Naproti tomu L buňky jsou buňky hladovějící, s nízkou hladinou glutamátu a vypnutou TOR dráhou (Čáp et al., 2012; Váchová et al., 2013), Naproti tomu L buňky, jsou buňky hladovějící, s nízkou hladinou glutamátu a vypnutou TOR dráhou (Liu a Butow, 2006; Jazwinski, 2014).

6.2.2 Identifikace nových cílů RTG dráhy v buněčných subpopulacích kolonie a jejich funkce v metabolismu

V další práci jsme se zaměřili na identifikaci dalších, nových cílových proteinů podléhajících regulaci RTG dráhy a na určení buněčných procesů, které jsou jí ovlivněny. Analyzovali jsme proteom jednotlivých buněčných subpopulací různě ovlivněných RTG dráhou. Rozdělili jsme acidickou kolonii na horní a dolní část a alkalickou kolonii na U buňky, horní L buňky a dolní L buňky. V analýze bylo cílem zjistit cílové proteiny regulace Rtg1p a Mks1p. Pro zpřesnění výsledků jsme pro každý regulátor použili dvojici kmenů, abychom redukovali vliv nespecifického pozadí a rozdíly, které nesouvisejí s RTG regulací. Pro MKS1 regulaci jsme použili kombinaci delečních kmenů *mks1* a *rtg2/mks1*, kdy Rtg2p funguje v regulační dráze před Mks1p, a tedy vliv obou konstruktů na RTG signalizaci by měl být podobný. Pro RTG1 regulaci jsme použili kombinaci delečních kmenů *rtg1* a *rtg1/mks1*, kdy Mks1p funguje v regulační dráze před Rtg1p, a tedy opět by měl být fenotyp obou kmenů podobný. Tyto dvě skupiny jsme pak porovnávali s rodičovským kmenem BY4742 s cílem identifikovat cílové proteiny RTG dráhy. Vybrané nové cílové proteiny RTG dráhy jsme poté označili pomocí GFP a následnou mikroskopickou analýzou řezů jejich kolonií a kvantifikací pomocí western a Northern blotů, čímž jsme verifikovali výsledky proteomické analýzy.

V proteomických datech jsme odhalili tři velké skupiny genů, které jsou různým způsobem regulovány RTG dráhou. První skupina obsahuje proteiny regulované klasicky RTG dráhou, kdy dochází k expresi pozitivně regulované pomocí Rtg1p a negativně regulované skrze Mks1p. Druhá skupina obsahuje proteiny, které jsou aktivovány přes Rtg1p, ale nedochází u nich k represi pomocí Mks1p. Ve třetí skupině jsou geny, které jsou negativně regulovány prostřednicnictvím Rtg1p.

Mezi proteiny první skupiny, které jsou klasicky regulované, patří už dříve zmíněné Ato1p, Ato2p a Cit2p. Většina proteinů této skupiny je však typická pro U buňky alkalické kolonie, což bylo potvrzeno i mikroskopickou a western blot analýzami, a má expresní profily podobné Ato1p a Ato2p (Ato-větev regulace RTG dráhy). Z proteinů, které náleží do první skupiny a mají podobný proteomický profil jako Cit2p (Cit2-větev regulace RTG dráhy), jsou to Dld3p, který byl identifikován dříve jako RTG dependentní (Liu a Butow, 1999), a nově také Ree1p, což je cytoplazmatický protein podílející se na regulaci enolázy (Choi et al., 2008). Tedy jejich exprese je v alkalické fázi růstu typická pro L buňky. Cit2p a Dld3p jsou exprimovány v acidické fázi růstu v horní části kolonie. Po přechodu z acidické do alkalické fáze dochází k degradaci těchto proteinů v U buňkách a exprese zůstává spuštěna v horních L buňkách. Rozdíl mezi Dld3p a Cit2p je však v tom, že při deleci *mks1* dochází k expresi Dld3p i v dolních L buňkách – na rozdíl od exprese Cit2p. Exprese těchto proteinů (Cit2p a

Dld3p) probíhá v buňkách, ve kterých je neaktivní TORC1 (Čáp et al., 2012; Váchová et al., 2013), což by odpovídalo předchozím výsledkům, kdy aktivní TORC1 reprimuje RTG dráhu, potažmo expresi Cit2p a Dld3p (Dilova et al., 2002; Dilova a Powers, 2006; Giannattasio et al., 2005). Je velmi zajímavé, že jsme v koloniích identifikovali tak malý počet cílových proteinů RTG dráhy, které mají podobný profil exprese jako Cit2p, což je nejčastěji používaný marker aktivity RTG dráhy. Většina námi identifikovaných proteinů je naopak regulována v rozporu s dřívějším modelem fungování RTG dráhy.

U vybraných proteinů první skupiny jsme také pomocí northern blot analýzy ověřili, že výsledky získané pomocí mikroskopické analýzy a western blot analýzy korelují s úrovní mRNA, a tedy regulace těchto proteinů probíhá převážně na transkripční úrovni.

Druhá skupina proteinů je také pozitivně regulována pomocí Rtg1p, ale na rozdíl od první skupiny, nedochází u ní k výrazné represi skrze Mks1p, naopak u některých cílových proteinů po deleci *mks1* došlo ke snížení jejich exprese.

Velká část proteinů této druhé skupiny je specificky produkována v U buňkách. Mezi těmito proteiny jsme identifikovali podskupinu, jež je zapojena do biosyntézy aminokyselin. Tato podskupina proteinů není v U buňkách regulována pomocí Mks1p a delece *mks1* nemá na jejich expresi v U buňkách vliv. Avšak při deleci *mks1* zároveň dochází ke spuštění jejich exprese v horních L buňkách. Dříve jsme ukázali, že exprese Cit2p je v horních L buňkách alkalické kolonie regulována pomocí Rtg1p/Mks1p a že při deleci *mks1* dochází ke zvýšení exprese Cit2p. Zároveň však delece *mks1* nemá vliv na produkci Cit2p v U buňkách. To nám ukazuje, že negativní regulace pomocí Mks1p je v U buňkách pro některé proteiny regulované klasicky pomocí RTG dráhy méně účinná, popřípadě na ně nepůsobí. Proto je tady i možnost, že skupina genů zapojených do metabolismu aminokyselin v U buňkách by mohla být klasicky regulována prostřednictvím Rtg1p/Mks1p.

Proteinů druhé skupiny, které jsou exprimovány hlavně v L buňkách, je výrazně méně a delece *mks1* nemá žádný vliv na jejich expresi. Mezi těmito proteiny je jediná významná funkční skupina, která se podílí na biosyntéze thiaminu. Kromě L buněk probíhá jejich exprese i v acidické fázi růstu kolonie.

Třetí skupina zahrnuje proteiny, které jsou negativně regulovány pomocí Rtg1p a ve většině případů jsou nezávislé na regulaci Mks1p. Podobně jako druhá skupina se tyto proteiny téměř nevyskytují během acidické fáze růstu a nacházíme je především v U buňkách. Velká část těchto proteinů souvisí s mitochondriemi, a to především s mitochondriální translací a funkcí mitochondriálních ribozomů.

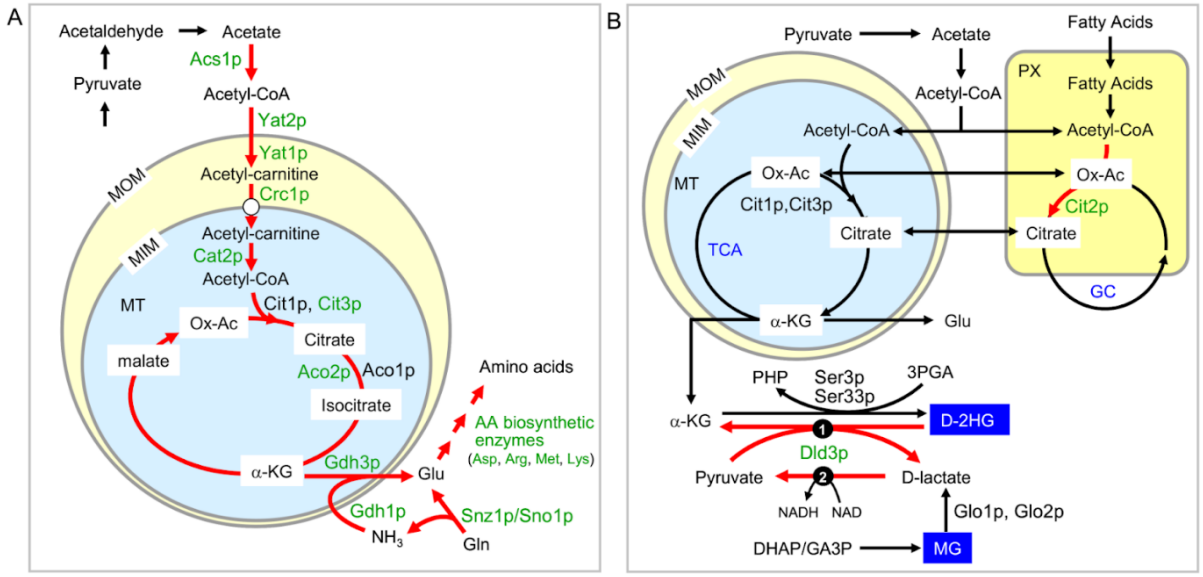
Při analýze výsledků pozitivní regulace RTG dráhy pro první a druhou skupinu genů jsme identifikovali část metabolismu regulovaného RTG dráhou. Týká se to drah spojených s metabolismem acetyl-CoA. Můžeme rozlišit dva způsoby metabolismu acetyl-CoA ovlivněné pomocí

RTG dráhy. První je cesta, kdy se acetyl-CoA vzniklý z acetátu nebo β-oxidací mastných kyselin dostává pomocí karnitinového kyvadlového přenosu do mitochondrií, kde je následně zpracován v TCA cyklu. Druhá cesta je zpracování acetyl-CoA přes oxalacetát na citrát pomocí Cit2p. Citrát je následně buď transportován do mitochondrií a zpracován v TCA cyklu, nebo je využit v glyoxylátovém cyklu (Obrázek 35) (Liu a Butow, 2006; van Rossum et al., 2016; Xiberras et al., 2019).

První cesta je s vysokou pravděpodobností typická pro U buňky v alkalické fázi růstu kolonie. Exprese genů *ACS1*, *YAT1/2*, *CRC1*, *CAT2*, *CIT3* a *ACO2* je typická pro tento typ buněk a je závislá na RTG dráze. Již dříve byly identifikovány některé geny této dráhy v TCA cyklu (*CIT1*, *ACO1* a *IDH1/2*), jejich exprese byla zvýšena v buňkách s respirační deficiencí, avšak nebyla u nich prokázána souvislost s RTG dráhou (Liu a Butow, 1999; Liu a Butow, 2006), což může být také vysvětleno tím, že tyto proteiny jsou spíše regulovány Ato-větví, a pro detekci aktivity RTG dráhy se používá Cit2p. V U buňkách na tuto dráhu navazuje skupina regulovaných genů *GDH1/3*, podílející se na syntéze glutamátu z α-ketoglutarátu a NH_3, a komplex *SNZ1/SNO1,* tvořící glutamát z glutaminu. Dále jsme ve druhé skupině genů pozitivně regulovaných pomocí *RTG1* a bez zapojení *MKS1* identifikovali velkou množinu genů podílejících se na syntéze dalších aminokyselin. Toto naznačuje možnost, že hlavní úlohou regulace RTG dráhy v U buňkách je propojení využití odpadních látek (acetátu) a živin, které mohou být poskytovány L buňkami (Čáp et al., 2012), k syntéze aminokyselin (*Obrázek 35*). Vyšší exprese *CIT3* a *ICL2*, kterou jsme zaznamenali, by navíc mohla buňkám pomáhat se vypořádat s některými odpadními produkty metabolismu aminokyselin, jako je například propionyl-CoA, který může vznikat při degradaci aminokyselin s rozvětveným řetězcem a je odstraňován přes metylcitrátovou cestu s tvorbou pyruvátu (Epstein et al., 2001; Graybill et al., 2007).

Druhá cesta acetyl-CoA je spíše typická pro buňky v horní části acidické kolonie a horní části L buněk v alkalické kolonii, což jsou buňky s neaktivním TORC1 komplexem, toto odpovídá profilu Cit2-větve regulace. V této cestě jsou pouze dva identifikované cílové proteiny RTG dráhy – a to citrátsyntáza Cit2p a D-laktátdehydrogenáza Dld3p, které jsou klasicky regulované RTG dráhou (Liu a Butow, 2006). Enzym Cit2p zpracovává acetyl-CoA na citrát, který je následně buďto zpracován v mitochondriích, nebo využit v glyoxylátovém cyklu (Liu a Butow, 2006; van Rossum et al., 2016; Xiberras et al., 2019). Enzym Dld3p by potom mohl sloužit také při zpracování toxických metabolitů D-2-hydroxyglutarátu (D-2HG) (Becker-Kettern et al., 2016) a methylglyoxalu (MG) (Pallotta, 2012). D-2HG vzniká při biosyntéze serinu a glycinu, kdy v prvním kroku syntézy těchto aminokyselin 3-fosfoglycerátdehydrogenázy Ser3p a Ser33p katalyzují oxidaci 3-fosfoglycerátu a redukci α-ketoglutarátu na D-2HG. U Dld3p byla zjištěna také transhydrogenázová aktivita, díky které oxiduje D-2HG na α-ketoglutarát a redukuje pyruvát na D-laktát (Becker-Kettern et al., 2016). MG vzniká neenzymaticky z dihydroxyaceton-fosfátu/glyceraldehyd-3-fosfátu při zhoršených podmínkách

metabolismu glukózy a oxidačním stresu (Pallotta, 2012; Stewart et al., 2013) a je následně přeměněn na D-laktát, který je poté pomocí cytosolického Dld3p oxidován na pyruvát, jenž může vstupovat do glukoneogeneze (Pallotta, 2012) (*Obrázek 35*). To by souhlasilo s modelem vývoje kolonie, kde L buňky mají zvýšený stres s vyšší hladinou ROS a spuštěnou glukoneogenezi (Čáp et al., 2012; Čáp et al., 2015).



Obrázek 35: Schéma metabolických funkcí regulovaných pomocí RTG dráhy v U buňkách (A) a L buňkách (B) (Plocek et al., 2021).

Při studiu regulace RTG dráhy jsme pracovali s modelem vývoje a diferenciace hladké kolonie na GM médiu, kdy při přechodu z acidické do alkalické fáze růstu dochází k diferenciaci kolonie na dvě hlavní subpopulace buněk, U a L buňky. U buňky jsou metabolicky velmi aktivní, avšak – přestože kolonie roste na respiračním médiu – mají velké mitochondrie s redukovanými kristami se sníženou respirační aktivitou. Buňky mají řadu nestandardně zapnutých regulací, jako aktivní TORC1 dráha, aktivní autofagie, aktivní GCN4 a další. Naproti tomu pro L buňky platí, že se jedná o hladovějící buňky, které však mají dobře vyvinuté a respirující mitochondrie s neaktivní TORC1 dráhou. V tomto modelu spodní L buňky poskytují živiny U buňkám (více v kapitole 3.3.3) (Čáp et al., 2012; Čáp et al., 2015). V našich experimentech jsme pracovali jak s obřími koloniemi, které vznikají z buněčné suspenze, tak s mikrokoloniemi, které vznikají z jedné buňky. Rozdíly v diferenciaci mezi těmito dvěma typy kolonií jsou minimální. Vlastnosti U buněk, které by mohly mít vliv na RTG dráhu, jako jsou TORC1, snížená funkce mitochondrií, nízká hladina ROS, se u obou typů kolonií neliší. Menší rozdíly však nastávají při porovnání L buněk z obou typů kolonií. Pro oba typy kolonií platí, že L buňky mají vyšší respirační kapacitu a vyšší produkci ROS. L buňky z mikrokolonií se však oproti L buňkám z obřích kolonií liší tím, že nevykazují zvýšenou citlivost na některé stresy, jako jsou tepelný šok

a ošetření etanolem (Váchová et al., 2013). Pro Ato- a Cit2-větve RTG regulace se mikrokolonie jeví být stejným experimentálním modelem, jako jsou obří kolonie. Rozdíly mezi mikrokoloniemi a obřími koloniemi jsou důležité hlavně při studiu „viability" větve RTG regulace, zodpovědné za přežívání buněk. Ve srovnání s obřími koloniemi má v mikrokoloniích tato regulace menší vliv na buňky v dolní části kolonie, což by mohlo ukazovat na to, že aktivní RTG dráha je důležitá pro přežívání buněk, které v rámci kolonie slouží jako zdroj živin pro U buňky (Čáp et al., 2012) a které svou morfologií připomínají savčí tkáň se znaky kachexie (Khamoui a Kim, 2012). Rozdělení Cit2-větve a „viability" větve RTG signalizace v L buňkách by také mohlo ukazovat, že lepší přežívání buněk v tekutých kulturách závislé na RTG dráze (Kirchman et al., 1999), by nemuselo tolik záviset na změnách spojených s regulací Cit2p. Nevýhodou mikrokolonií se tedy zdá hlavně to, že na rozdíl od obřích kolonií v nich nedokážeme separovat jednotlivé buněčné subpopulace.

6.2.3 Aktivita jednotlivých větví RTG dráhy vzhledem k TORC1 regulaci

V našich datech jsme identifikovali dvě skupiny genů, které jsou v rámci kolonie pozitivně regulovány pomocí RTG dráhy za přítomnosti aktivního TORC1. Většina cílových genů RTG dráhy, které jsme identifikovali v naší analýze, je za normálních podmínek exprimována v U buňkách alkalické kolonie a má podobný profil exprese jako Ato proteiny Ato-větve RTG dráhy, tyto geny jsou v U buňkách pozitivně regulovány pomocí Rtg1p a negativně regulovány pomocí Mks1p. V horních L buňkách jsou navíc negativně regulovány pomocí Mks1p. Zároveň je v U buňkách větší počet proteinů, především těch, jež se účastní metabolismu aminokyselin aminokyselin, které jsou regulovány pouze pozitivně pomocí Rtg1p v U buňkách a pouze částečně negativně pomocí Mks1p v horních L buňkách. Regulace v U buňkách přitom probíhá za podmínek aktivního TORC1 a vysokého intracelulárního glutaminu (Čáp et al., 2012), což jsou podmínky, u kterých bylo publikováno, že inhibují aktivitu RTG dráhy v tekutých kulturách, to se v naprosté většině zjišťovalo pomocí exprese genu *CIT2* jako hlavního markeru aktivity RTG dráhy (Dilova et al., 2002; Giannattasio et al., 2005; Komeili et al., 2000; Tate et al., 2002).

Druhá skupina je exprimována v buňkách s neaktivním TORC1. Týká se to oblasti buněk v horní části acidické kolonie a horní části L buněk alkalické kolonie. Pro L buňky také platí, že se jedná o hladovějící buňky, které však mají dobře vyvinuté a respirující mitochondrie (Čáp et al., 2012; Čáp et al., 2015). Kromě Cit2p, který je využíván jako markerový protein aktivity RTG dráhy, má podobný profil exprese ještě Dld3p. Tyto dva cílové geny jsou klasicky pozitivně regulovány pomocí Rtg1p a negativně pomocí Mks1, avšak v U buňkách dochází po přechodu z acidické do alkalické fáze růstu k

jejich degradaci. A ani delece negativního regulátoru Mks1p nemění profil jejich exprese v U buňkách. V případě Dld3p specificky platí, že delece *mks1* spouští jeho expresi i v dolních L buňkách.

O upregulaci RTG dráhy je toho známo relativně málo. Buněčná odpověď na mitochondriální dysfunkci probíhající přes Rtg2p je oddělitelná od regulace RTG dráhou pomocí TORC1 (Giannattasio et al., 2005) a propojení RTG dráhy a TORC1 komplexu je zprostředkováno přes negativní regulátor Lst8p (Komeili et al., 2000; Liu et al., 2001). Jeden z navržených modelů ukazuje, že vliv TORC1 se projevuje fosforylací Mks1p, který následně v komplexu Bmh1/2p podporuje fosforylaci Rtg3p čímž udržuje komplex Rtg1p/Rtg3p v cytosolu. Při nízké koncentraci gluaminu a neaktivním TORC1 dochází k defosforylaci Mks1p a Rtg2p díky tomu defosforyluje Rtg1p/Rtg3p komplex, který může vstoupit do jádra a pustit expresi genů RTG odpovědi (Dilova a Powers, 2006). Analýza mutantních alel genu LST8 však ukázala, že tento regulátor, který je součástí TORC1, působí v regulaci RTG dráhy jak před Rtg2p, tak za ním (Chen a Kaiser, 2003; Liu et al., 2001). A především ukázala, že inhibice TOR komplexu rapamycinem indukuje expresi Cit2p, která je striktně závislá na Rtg2p (Giannattasio et al., 2005). Kromě TOR dráhy se na regulaci RTG dráhy může podílet také RAS dráha. Při studiu regulace filamentárního růstu bylo ukázáno, že RAS a RTG dráhy koregulovaly společnou sadu cílových genů (Chow et al., 2019).

Závěrem lze shrnout, že retrográdní odpověď je u kvasinek *S. cerevisiae* výrazně komplexnější, než se dosud jevilo, a zahrnuje kromě již popsané RTG dráhy (Butow a Avadhani, 2004) a *AFO1/MRPL25* dráhy (Heeren et al., 2009) pravděpodobně i další způsoby retrográdní odpovědi na těchto dvou drahách nezávislé (Liu a Butow, 2006).

Ukázali jsme, že vlastní RTG dráha ovlivňuje výrazně více různých buněčných procesů, než se předpokládalo. V našem modelu kvasinkové kolonie jsme pozorovali několik různých způsobů regulace, od klasické pozitivní RTG odpovědi v Cit2-větvi při neaktivním TORC1 v horních L buňkách přes pozitivní RTG odpověď při aktivním TORC1 v Ato-větvi a negativní RTG regulaci genů mitochondriální translace v U buňkách po pozitivní vliv RTG na přežívání dolních L buněk. V nedávné době navíc byl popsán pozitivní vliv RTG genů na buněčnou odpověď na kyselý stres, která vede k odolnosti buněk proti regulované buněčné smrti indukované kyselinou octovou (Guaragnella et al., 2013; Guaragnella et al., 2019). Autoři došli k závěru, že tato odpověď je nezávislá na spuštěné RTG dráze, když jako marker spuštěné dráhy byl použit Cit2p. Na základě našich výsledků však je zřejmé, že aktivita RTG dráhy se nedá sledovat pouze na základě změn exprese Cit2p, a proto je možné, že odpověď na kyselý stres je další dráhou RTG regulace.

Také pravděpodobně platí, že vlastní regulace RTG je mnohem komplexnější, než se uvádělo. V našich výsledcích jsme ukázali, že velká část nově identifikovaných cílových proteinů RTG dráhy je

v kolonii exprimována za podmínek aktivní TORC1 dráhy, která je považována za její negativní regulátor (Giannattasio et al., 2005; Dilova a Powers, 2006;).

Je zřejmé, že RTG dráha ovlivňuje mnohem větší množství dějů v buňce, než se předpokládalo. V závislosti na koregulacích, které jsou často neznámé, dokáže RTG dráha regulovat velmi rozdílné skupiny proteinů a rozhodně se její aktivita nedá posuzovat pouze na základě změny exprese Cit2p. Regulace, o kterých se v literatuře píše, že jsou na RTG dráze nezávislé, mohou být ve skutečnosti závislé, jen mají jinou větev regulace. Bylo rovněž publikováno, že dráhy RAS a RTG v koregulují společnou sadu cílových genů (Chow et al., 2019), z nichž některé z nich jsme identifikovali také v našich výsledcích (Plocek et al., 2021) a také že RTG dráha je zapojená do filamentárního růstu (Chow et al., 2019). To nás přivádí k zajímavé možnosti, propojení RTG dráhy s regulací Cyc8p a Tup1p ve strukturovaných kolonií.

7. Závěr

Tato práce se zabývala vývojem a diferenciací mnohobuněčných struktur kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. -Získané výsledky rozšiřují naše znalosti o formování mnohobuněčných struktur a regulačních drahách do nich zapojených. Publikované výsledky se dají se shrnout do několika bodů:

- Při vývoji SLI biofilmů dochází k antagonistické regulaci adheze kvasinkových buněk k podkladu pomocí regulace exprese Flo11p, kdy TUP1 funguje jako pozitivní regulátor v podmínkách bez glukózy a CYC8 jako negativní regulátor nezávisle na přítomnosti glukózy. Přítomnost glukózy, která ovlivňuje hladinu Cyc8p, má zásadní vliv na utváření SLI biofilmu a jeho stabilitu. Rovněž jsme ukázali, že i malé zvýšení koncentrace glukózy má za následek uvolňování buněk z biofilmu.

- Vyvinuli jsme novou metodu fixace a přípravy vzorků nárůstů neadherovaných buněk a SLI biofilmů z mikrotitračních destiček, která nám umožňuje mikroskopické sledování vývoje a diferenciace biofilmu za fyziologických podmínek.

- Vývoj strukturovaných obřích kolonií probíhá podle modelu distribuce buněk „panter“, zatímco u hladkých kolonií podle modelu distribuce buněk „zebra“. Rozdíly mezi oběma typy struktur vznikají již v časných fázích vývoje kolonie a na přepínání mezi těmito typy nemá vliv polarita buněčného pučení ani oddělování buněk. Důležitá je naopak buněčná adheze zprostředkované Flo11p, kdy delece *FLO11* genu mění distribuci buněk z „panter“ na „zebra“ typ.

- Ukázali jsme, že RTG dráha je v rámci vývoje kvasinkové kolonie na GM médiu komplexní a rozdělená na tři divergentní části, Ato-větev, Cit2-větev a „viability“ větev. V diferencované alkalické kolonii je Ato-větev aktivní v U buňkách diferencované kolonie za podmínek aktivního TORC1 a markerovými proteiny jsou Ato1p (Ady2p) a Ato2p. Cit2-větev je aktivní v horní části L buněk při neaktivním TORC1 a markerovém proteinu Cit2p. „Viability“ větev je aktivní v dolní části L buněk a je zodpovědná za přežívání této subpopulace.

- Pomocí proteomické analýzy buněčných subpopulací acidické a alkalické kolonie jsme identifikovali řadu nových cílových proteinů RTG dráhy. Identifikovali jsme tři skupiny genů, kdy první skupina je pozitivně regulována pomocí Rtg1p a negativně skrz Mks1p. Druhá skupina je také pozitivně regulována Rtg1p, avšak bez většího efektu Mks1p. Třetí skupina je negativně regulována pomocí Rtg1p bez zapojení Mks1p. Naše výsledky ukázaly, že RTG dráha hraje důležitou roli v aktivaci metabolických procesů a to především při adaptaci U buněk.

8. Seznam použité literatury

Al-Fattani, M. A., a Douglas, L. J. (2006). Biofilm matrix of Candida albicans and Candida tropicalis: Chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*, *55*(8), 999–1008. https://doi.org/10.1099/jmm.0.46569-0

Andersen, K. S., Bojsen, R., Sørensen, L. G. R., Nielsen, M. W., Lisby, M., Folkesson, A., a Regenberg, B. (2014). Genetic basis for saccharomyces cerevisiae biofilm in liquid medium. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *4*(9), 1671–1680. https://doi.org/10.1534/g3.114.010892

Baillie, G. S., a Douglas, L. J. (2000). Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *46*(3), 397–403. https://doi.org/10.1093/jac/46.3.397

Becker-Kettern, J., Paczia, N., Conrotte, J. F., Kay, D. P., Guignard, C., Jung, P. P., a Linster, C. L. (2016). Saccharomyces cerevisiae Forms D-2-Hydroxyglutarate and Couples Its Degradation to D-Lactate Formation via a Cytosolic Transhydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(12), 6036–6058. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.704494

Beekman, C. N., Cuomo, C. A., Bennett, R. J., a Ene, I. V. (2021). Comparative genomics of white and opaque cell states supports an epigenetic mechanism of phenotypic switching in Candida albicans. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *11*(2). https://doi.org/10.1093/G3JOURNAL/JKAB001

Bentz, M. L., Joseph Sexton, D., Welsh, R. M., a Litvintseva, A. P. (2019). Phenotypic switching in newly emerged multidrug-resistant pathogen Candida auris. *Medical Mycology*, *57*(5), 636–638. https://doi.org/10.1093/mmy/myy100

Bidlingmaier, S., Weiss, E. L., Seidel, C., Drubin, D. G., a Snyder, M. (2001). The Cbk1p Pathway Is Important for Polarized Cell Growth and Cell Separation in Saccharomyces cerevisiae . *Molecular and Cellular Biology*, *21*(7), 2449–2462. https://doi.org/10.1128/mcb.21.7.2449-2462.2001

Bojsen, R., Regenberg, B., a Folkesson, A. (2014). Saccharomyces cerevisiae biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. *BMC Microbiology*, *14*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s12866-014-0305-4

Braun, B. R., a Johnson, A. D. (1997). Control of filament formation in Candida albicans by the transcriptional repressor TUP1. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5322), 105–109. https://doi.org/10.1126/science.277.5322.105

Brimacombe, C. A., Sierocinski, T., a Dahabieh, M. S. (2020). A white-to-opaque-like phenotypic switch in the yeast Torulaspora microellipsoides. *Communications Biology*, *3*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s42003-020-0815-6

Bruckmann, A., Hensbergen, P. J., Balog, C. I. A., Deelder, A. M., de Steensma, H. Y., a van Heusden, G. P. H. (2007). Post-transcriptional control of the Saccharomyces cerevisiae proteome by 14-3-3 proteins. *Journal of Proteome Research*, *6*(5), 1689–1699. https://doi.org/10.1021/pr0605522

Brückner, S., a Mösch, H. U. (2012). Choosing the right lifestyle: Adhesion and development in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(1), 25–58.

https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00275.x

Butow, R. A., a Avadhani, N. G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular Cell*, *14*(1), 1–15. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00179-0

Cardamone, M. D., Tanasa, B., Cederquist, C. T., Huang, J., Mahdaviani, K., Li, W., Rosenfeld, M. G., Liesa, M., a Perissi, V. (2018). Mitochondrial Retrograde Signaling in Mammals Is Mediated by the Transcriptional Cofactor GPS2 via Direct Mitochondria-to-Nucleus Translocation. *Molecular Cell*, *69*(5), 757-772.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.037

Cavalheiro, M., a Teixeira, M. C. (2018). Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Frontiers in Medicine*, *5*, 28. https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028

Conlan, R. S., a Tzamarias, D. (2001). Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *Journal of Molecular Biology*, *309*(5), 1007–1015. https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4742

Cordero, O. X., a Datta, M. S. (2016). Microbial interactions and community assembly at microscales. *Current Opinion in Microbiology*, *31*, 227–234. https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.015

Čáp, M., Štěpánek, L., Harant, K., Váchová, L., a Palková, Z. (2012). Cell Differentiation within a Yeast Colony: Metabolic and Regulatory Parallels with a Tumor-Affected Organism. *Molecular Cell*, *46*(4), 436–448. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.001

Čáp, M., Váchová, L., a Palková, Z. (2009). Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(47), 32572–32581. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022871

Čáp, M., Váchová, L., a Palková, Z. (2015). Longevity of U cells of differentiated yeast colonies grown on respiratory medium depends on active glycolysis. *Cell Cycle*, *14*(21), 3488–3497. https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1093706

Dalal, C. K., Zuleta, I. A., Mitchell, K. F., Andes, D. R., El-Samad, H., a Johnson, A. D. (2016). Transcriptional rewiring over evolutionary timescales changes quantitative and qualitative properties of gene expression. *eLife*, *5*(September2016), 1–24. https://doi.org/10.7554/eLife.18981

de Groot, P. W. J., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M., a Chauhan, N. (2013). Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. *Eukaryotic Cell*, *12*(4), 470–481. https://doi.org/10.1128/EC.00364-12

Dilova, I., Chen, C. Y., a Powers, T. (2002). Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in S. cerevisiae. *Current Biology*, *12*(5), 389–395. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00677-2

Dilova, I., a Powers, T. (2006). Accounting for strain-specific differences during RTG target gene regulation in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Research*, *6*(1), 112–119. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00008.x

Dohrmann, P. R., Butler, G., Tamai, K., Dorland, S., Greene, J. R., Thiele, D. J., a Stillman, D. J. (1992). Parallel pathways of gene regulation: Homologous regulators SWI5 and ACE2 differentially control transcription of HO and chitinase. *Genes and Development*, *6*(1), 93–104.

https://doi.org/10.1101/gad.6.1.93

Edskes, H. K., Hanover, J. A., a Wickner, R. B. (1999). Mks1p is a regulator of nitrogen catabolism upstream of Ure2p in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, *153*(2), 585–594. https://doi.org/10.1093/genetics/153.2.585

Enache-Angoulvant, A., a Hennequin, C. (2005). Invasive saccharomyces infection: A comprehensive review. *Clinical Infectious Diseases*, *41*(11), 1559–1568. https://doi.org/10.1086/497832

Ene, I. V., Lohse, M. B., Vladu, A. V., Morschhäuser, J., Johnson, A. D., a Bennett, R. J. (2016). Phenotypic profiling reveals that Candida albicans opaque cells represent a metabolically specialized cell state compared to default white cells. *mBio*, *7*(6), 1–20. https://doi.org/10.1128/mBio.01269-16

Epstein, C. B., Waddle, J. A., Hale, W. 4th, Davé, V., Thornton, J., Macatee, T. L., Garner, H. R., a Butow, R. A. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(2), 297–308. https://doi.org/10.1091/mbc.12.2.297

Finkel, J. S., Xu, W., Huang, D., Hill, E. M., Desai, J. V, Woolford, C. A., Nett, J. E., Taff, H., Norice, C. T., Andes, D. R., Lanni, F., a Mitchell, A. P. (2012). Portrait of Candida albicans adherence regulators. *PLoS Pathogens*, *8*(2), e1002525. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002525

Fleming, A. B., Beggs, S., Church, M., Tsukihashi, Y., a Pennings, S. (2014). The yeast Cyc8-Tup1 complex cooperates with Hda1p and Rpd3p histone deacetylases to robustly repress transcription of the subtelomeric FLO1 gene. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1839*(11), 1242–1255. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.07.022

García-Sánchez, S., Mavor, A. L., Russell, C. L., Argimon, S., Dennison, P., Enjalbert, B., a Brown, A. J. P. (2005). Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, Candida albicans. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(6), 2913–2925. https://doi.org/10.1091/mbc.e05-01-0071

Giannattasio, S., Liu, Z., Thornton, J., a Butow, R. A. (2005). Retrograde response to mitochondrial dysfunction is separable from TOR1/2 regulation of retrograde gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(52), 42528–42535. https://doi.org/10.1074/jbc.M509187200

Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kačániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., a Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 841. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841

Granek, J A, a Magwene, P. M. (2010). Environmental and Genetic Determinants of Colony Morphology in Yeast. *PLoS Genet*, *6*(1), 1000823. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000823

Graybill, E. R., Rouhier, M. F., Kirby, C. E., a Hawes, J. W. (2007). Functional comparison of citrate synthase isoforms from S. cerevisiae. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *465*(1), 26–37. https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.04.039

Guaragnella, N., a Butow, R. A. (2003). ATO3 encoding a putative outward ammonium transporter is an RTG-independent retrograde responsive gene regulated by GCN4 and the Ssy1-Ptr3-Ssy5 amino acid sensor system. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(46), 45882–45887.

https://doi.org/10.1074/jbc.M309301200

Guaragnella, N., Stirpe, M., Marzulli, D., Mazzoni, C., a Giannattasio, S. (2019). Acid stress triggers resistance to acetic acid-induced regulated cell death through Hog1 activation which requires RTG2 in yeast. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/4651062

Guaragnella, N., Ždralević, M., Lattanzio, P., Marzulli, D., Pracheil, T., Liu, Z., Passarella, S., Marra, E., a Giannattasio, S. (2013). Yeast growth in raffinose results in resistance to acetic-acid induced programmed cell death mostly due to the activation of the mitochondrial retrograde pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833*(12), 2765–2774. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.017

Gulati, a Nobile, C. J. (2017). Candida albicans biofilms. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology: Second Edition*, *18*(5), 63–75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50409-4_5

Guo, B., Styles, C. A., Feng, Q., a Fink, G. R. (2000). A Saccharomyces gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(22), 12158–12163. https://doi.org/10.1073/pnas.220420397

Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C., a Fink, G. R. (2004). Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell*, *116*(3), 405–415. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00118-7

Heeren, G., Rinnerthaler, M., Laun, P., von Seyerl, P., Kössler, S., Klinger, H., Hager, M., Bogengruber, E., Jarolim, S., Simon-Nobbe, B., Schüller, C., Carmona-Gutierrez, D., Breitenbach-Koller, L., Mück, C., Jansen-Dürr, P., Criollo, A., Kroemer, G., Madeo, F., a Breitenbach, M. (2009). The mitochondrial ribosomal protein of the large subunit, Afo1p, determines cellular longevity through mitochondrial back-signaling via TOR1. *Aging*, *1*(7), 622–636. https://doi.org/10.18632/aging.100065

Honigberg, S. M. (2011). Cell signals, cell contacts, and the organization of yeast communities. *Eukaryotic Cell*, *10*(4), 466–473. https://doi.org/10.1128/EC.00313-10

Chandra, J, Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., a Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, *183*(18), 5385–5394. https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001

Chen, E. J., a Kaiser, C. A. (2003). LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. *Journal of Cell Biology*, *161*(2), 333–347. https://doi.org/10.1083/jcb.200210141

Chen, H., a Fink, G. R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes and Development*, *20*(9), 1150–1161. https://doi.org/10.1101/gad.1411806

Choi, I.-D., Jeong, M.-Y., Ham, M.-S., Sung, H.-C., a Yun, C.-W. (2008). Novel Ree1 regulates the expression of ENO1 via the Snf1 complex pathway in Saccharomyces cerevisiae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *377*(2), 395–399. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.146

Chow, J., Starr, I., Jamalzadeh, S., Muniz, O., Kumar, A., Gokcumen, O., Ferkey, D. M., a Cullen, P. J. (2019). Filamentation regulatory pathways control adhesion-dependent surface responses in Yeast. *Genetics*, *212*(3), 667–690. https://doi.org/10.1534/genetics.119.302004

Ichikawa, T., Yoshiyama, N., Ohgane, Y., a Ikeda, R. (2016). Switching of colony morphology and adhesion activity of Trichosporon asahii clinical isolates. *Medical Mycology*, *54*(2), 189–196. https://doi.org/10.1093/mmy/myv089

Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., a Iimura, Y. (2004). FLO11 is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of NRG1 in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiology Letters*, *237*(2), 425–430. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.012

Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., a Iimura, Y. (2006). FLO11 is the primary factor in flor formation caused by cell surface hydrophobicity in wild-type flor yeast. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *70*(3), 660–666. https://doi.org/10.1271/bbb.70.660

Jazwinski, S. M. (2014). The retrograde response: a conserved compensatory reaction to damage from within and from without. *Progress in molecular biology and translational science*, *127*, 133–154. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394625-6.00005-2

Khamoui, A. V, a Kim, J. S. (2012). Candidate mechanisms underlying effects of contractile activity on muscle morphology and energetics in cancer cachexia. *European Journal of Cancer Care*, *21*(2), 143–157. https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2011.01287.x

Kirchman, P. A., Kim, S., Lai, C. Y., a Michal Jazwinski, S. (1999). Interorganelle signaling is a determinant of longevity in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, *152*(1), 179–190. https://doi.org/10.1093/genetics/152.1.179

Komeili, A., Wedaman, K. P., O'Shea, E. K., a Powers, T. (2000). Mechanism of metabolic control: Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *Journal of Cell Biology*, *151*(4), 863–878. https://doi.org/10.1083/jcb.151.4.863

Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., a Palková, Z. (2003). Domestication of wild Saccharomyces cerevisiae is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Molecular Microbiology*, *47*(3), 745–754. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03332.x

Lachke, S. A., Joly, S., Daniels, K., a Soll, D. R. (2002). Phenotypic switching and filamentation in Candida glabrata. *Microbiology*, *148*(9), 2661–2674. https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2661

Laera, L., Guaragnella, N., Ždralević, M., Marzulli, D., Liu, Z., a Giannattasio, S. (2016). The transcription factors ADR1 or CAT8 are required for RTG pathway activation and evasion from yeast acetic acid-induced programmed cell death in raffinose. *Microbial Cell*, *3*(12), 621–631. https://doi.org/10.15698/mic2016.12.549

Lee, H., Chang, Y. C., Varma, A., a Kwon-Chung, K. J. (2009). Regulatory diversity of TUP1 in Cryptococcus neoformans. *Eukaryotic Cell*, *8*(12), 1901–1908. https://doi.org/10.1128/EC.00256-09

Liu, Z., a Butow, R. A. (1999). A Transcriptional Switch in the Expression of Yeast Tricarboxylic Acid Cycle Genes in Response to a Reduction or Loss of Respiratory Function. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(10), 6720–6728. https://doi.org/10.1128/mcb.19.10.6720

Liu, Z., a Butow, R. A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annual Review of Genetics*, *40*(February 2006), 159–185. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090613

Liu, Z., Sekito, T., Epstein, C. B., a Butow, R. A. (2001). RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *EMBO Journal*, *20*(24), 7209–7219. https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7209

Liu, Z., Sekito, T., SŠpiírek, M., Thornton, J., a Butow, R. A. (2003). Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Molecular Cell*, *12*(2), 401–411. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00285-5

Liu, Z., Spírek, M., Thornton, J., a Butow, R. A. (2005). A novel degron-mediated degradation of the RTG pathway regulator, Mks1p, by SCFGrr1. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(10), 4893–4904. https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0516

Lorenz, M. C., Bender, J. A., a Fink, G. R. (2004). Transcriptional response of Candida albicans upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell*, *3*(5), 1076–1087. https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1076-1087.2004

Malcher, M., Schladebeck, S., a Mösch, H. U. (2011). The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, *187*(3), 717–730. https://doi.org/10.1534/genetics.110.125708

Mandal, S. M., Mahata, D., Migliolo, L., Parekh, A., Addy, P. S., Mandal, M., a Basak, A. (2014). Glucose directly promotes antifungal resistance in the fungal pathogen, Candida spp. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(37), 25468–25473. https://doi.org/10.1074/jbc.C114.571778

Maršíková, J., Pavlícková, M., Wilkinson, D., Váchová, L., Hlavácek, O., Hatáková, L., a Palková, Z. (2020). The Whi2p-Psr1p/Psr2p complex regulates interference competition and expansion of cells with competitive advantage in yeast colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(26), 15123–15131. https://doi.org/10.1073/pnas.1922076117

Maršíková, J., Wilkinson, D., Hlaváček, O., Gilfillan, G. D., Mizeranschi, A., Hughes, T., Begany, M., Rešetárová, S., Váchová, L., a Palková, Z. (2017). Metabolic differentiation of surface and invasive cells of yeast colony biofilms revealed by gene expression profiling. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12864-017-4214-4

Miller, M. G., a Johnson, A. D. (2002). White-opaque switching in Candida albicans is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, *110*(3), 293–302. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00837-1

Nobile, C. J., Andes, D. R., Nett, J. E., Smith, F. J., Yue, F., Phan, Q.-T., Edwards, J. E., Filler, S. G., a Mitchell, A. P. (2006). Critical role of Bcr1-dependent adhesins in C. albicans biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathogens*, *2*(7), e63. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020063

Nobile, C. J., Fox, E. P., Nett, J. E., Sorrells, T. R., Mitrovich, Q. M., Hernday, A. D., Tuch, B. B., Andes,

D. R., a Johnson, A. D. (2012). A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in Candida albicans. *Cell*, *148*(1–2), 126–138. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.048

Nobile, C. J., a Johnson, A. D. (2015). Candida albicans Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, *69*(1), 71–92. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330

Nobile, C. J., a Mitchell, A. P. (2005). Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the C. albicans transcription factor Bcr1p. *Current Biology : CB*, *15*(12), 1150–1155. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.047

Nobile, C. J., Nett, J. E., Hernday, A. D., Homann, O. R., Deneault, J.-S., Nantel, A., Andes, D. R., Johnson, A. D., a Mitchell, A. P. (2009). Biofilm matrix regulation by Candida albicans Zap1. *PLoS Biology*, *7*(6), e1000133. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000133

Octavio, L. M., Gedeon, K., a Maheshri, N. (2009). Epigenetic and conventional regulation is distributed among activators of FLO11 allowing tuning of population-level heterogeneity in its expression. *PLoS Genetics*, *5*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000673

Paiva, S., Devaux, F., Barbosa, S., Jacq, C., a Casal, M. (2004). Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, *21*(3), 201–210. https://doi.org/10.1002/yea.1056

Palková, Z., Devaux, F., Řičcová, M., Mináriková, L., Le Crom, S., a Jacq, C. (2002). Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(11), 3901–3914. https://doi.org/10.1091/mbc.E01-12-0149

Palková, Z., a Forstová, J. (2000). Yeast colonies synchronise their growth and development. *Journal of Cell Science*, *113*(11), 1923–1928. https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.1923

Palková, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M., a Forstova, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*, *390*(6659), 532–536. https://doi.org/10.1038/37398

Pallotta, M. L. (2012). Mitochondrial involvement to methylglyoxal detoxification: D-Lactate/Malate antiporter in Saccharomyces cerevisiae. *Antonie van Leeuwenhoek*, *102*(1), 163–175. https://doi.org/10.1007/s10482-012-9724-0

Pan, X., a Heitman, J. (2000). Sok2 Regulates Yeast Pseudohyphal Differentiation via a Transcription Factor Cascade That Regulates Cell-Cell Adhesion. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(22), 8364–8372. https://doi.org/10.1128/mcb.20.22.8364-8372.2000

Parikh, V. S., Morgan, M. M., Scott, R., Scott Clements, L., a Butow, R. A. (1987). The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science*, *235*(4788), 576–580. https://doi.org/10.1126/science.3027892

Park, H O, Chant, J., a Herskowitz, I. (1993). BUD2 encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast. *Nature*, *365*(6443), 269–274. https://doi.org/10.1038/365269a0

Park, Hay Oak, Bi, E., Pringle, J. R., a Herskowitz, I. (1997). Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, *94*(9), 4463–4468. https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4463

Peñalva, M. A., a Arst, H. N. J. (2004). Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annual Review of Microbiology*, *58*, 425–451. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123715

Piccirillo, S., a Honigberg, S. M. (2010). Sporulation patterning and invasive growth in wild and domesticated yeast colonies. *Research in Microbiology*, *161*(5), 390–398. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.04.001

Piccirillo, S., Mccune, A. H., Dedert, S. R., Kempf, C. G., Jimenez, B., Solst, S. R., Tiede-lewis, L. M., a Honigberg, S. M. (2019). *How Boundaries Form : Linked Nonautonomous*. *213*(December), 1373–1386.

Piccirillo, S., Morales, R., White, M. G., Smith, K., Kapros, T., a Honigberg, S. M. (2015). Cell differentiation and spatial organization in yeast colonies: Role of cell-wall integrity pathway. *Genetics*, *201*(4), 1427–1438. https://doi.org/10.1534/genetics.115.180919

Piccirillo, S., White, M. G., Murphy, J. C., Law, D. J., a Honigberg, S. M. (2010). The Rim101p/PacC pathway and alkaline pH regulate pattern formation in yeast colonies. *Genetics*, *184*(3), 707–716. https://doi.org/10.1534/genetics.109.113480

Pillai, U., Devasahayam, J., Kurup, A. N., a Lacasse, A. (2014). *Invasive Saccharomyces cerevisiae infection : A friend turning foe ? Full Text Introduction Case Report*. *25*(6), 15–16.

Plocek, V., Fadrhonc, K., Maršíková, J., Váchová, L., Pokorná, A., Hlaváček, O., Wilkinson, D., a Palková, Z. (2021). Mitochondrial Retrograde Signaling Contributes to Metabolic Differentiation in Yeast Colonies. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11). https://doi.org/10.3390/ijms22115597

Plocek, V., Váchová, L., Šťovíček, V., a Palková, Z. (2020). Cell distribution within yeast colonies and colony biofilms: How structure develops. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), 1–13. https://doi.org/10.3390/ijms21113873

Podholová, K., Plocek, V., Rešetárová, S., Kučerová, H., Hlaváček, O., Váchová, L., a Palková, Z. (2016). Divergent branches of mitochondrial signaling regulate specific genes and the viability of specialized cell types of differentiated yeast colonies. *Oncotarget*, *7*(13). https://doi.org/10.18632/oncotarget.8084

Purnapatre, K., a Honigberg, S. M. (2002). Meiotic differentiation during colony maturation in Saccharomyces cerevisiae. *Current Genetics*, *42*(1), 1–8. https://doi.org/10.1007/s00294-002-0331-x

Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., a Williams, C. (2012). Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, *2012*, 528521. https://doi.org/10.1155/2012/528521

Ratcliff, W. C., Fankhauser, J. D., Rogers, D. W., Greig, D., a Travisano, M. (2015). Origins of multicellular evolvability in snowflake yeast. *Nature Communications*, *6*(May 2014). https://doi.org/10.1038/ncomms7102

Reynolds, T B, a Fink, G. R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science (New*

York, N.Y.), *291*(5505), 878–881. https://doi.org/10.1126/science.291.5505.878

Reynolds, Todd B. (2018). Going with the flo: The role of flo11-dependent and independent interactions in yeast mat formation. *Journal of Fungi*, *4*(4). https://doi.org/10.3390/jof4040132

Roberts, R. L., Mösch, H. U., a Fink, G. R. (1997). 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in S. cerevisiae. *Cell*, *89*(7), 1055–1065. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80293-7

Robertson, L. S., a Fink, G. R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(23), 13783–13787. https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13783

Rodrigues, C., Rodrigues, M., a Henriques, M. (2019). Candida sp. Infections in Patients with Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(1), 76. https://doi.org/10.3390/jcm8010076

Rothermel, B. A., Shyjan, A. W., Etheredge, J. L., a Butow, R. A. (1995). Transactivation by Rtg1p, a basic helix-loop-helix protein that functions in communication between mitochondria and the nucleus in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(49), 29476–29482. https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29476

Rothermel, Beverly A., Thornton, J. L., a Butow, R. A. (1997). Rtg3p, a basic helix-loop-helix/leucine zipper protein that functions in mitochondrial-induced changes in gene expression, contains independent activation domains. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(32), 19801–19807. https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.19801

Rupp, S., Summers, E., Lo, H. J., Madhani, H., a Fink, G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO Journal*, *18*(5), 1257–1269. https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1257

Řičicová, M., Kučerová, H., Váchová, L., a Palková, Z. (2007). Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1768*(5), 1170–1178. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.02.011

Santangelo, G. M. (2006). Glucose Signaling in Saccharomyces cerevisiae . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(1), 253–282. https://doi.org/10.1128/mmbr.70.1.253-282.2006

Sekito, T., Liu, Z., Thornton, J., a Butow, R. A. (2002). RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to formation of yeast prion [URE3]. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(3), 795–804. https://doi.org/10.1091/mbc.01-09-0473

Sekito, T., Thornton, J., a Butow, R. A. (2000). Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(6), 2103–2115. https://doi.org/10.1091/mbc.11.6.2103

Shore, D. E., a Ruvkun, G. (2013). A cytoprotective perspective on longevity regulation. *Trends in Cell Biology*, *23*(9), 409–420. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.04.007

Si, H., Hernday, A. D., Hirakawa, M. P., Johnson, A. D., a Bennett, R. J. (2013). Candida albicans White and Opaque Cells Undergo Distinct Programs of Filamentous Growth. *PLoS Pathogens*, *9*(3). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003210

Smith, R. L., a Johnson, A. D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(7), 325–330. https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01592-9

Stewart, B. J., Navid, A., Kulp, K. S., Knaack, J. L. S., a Bench, G. (2013). D-Lactate production as a function of glucose metabolism in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast (Chichester, England)*, *30*(2), 81–91. https://doi.org/10.1002/yea.2942

Strachotová, D., Holoubek, A., Kučerová, H., Benda, A., Humpolíčková, J., Váchová, L., a Palková, Z. (2012). Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM). *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1818*(9), 2126–2134. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.005

Šťovíček, V., Váchová, L., Begany, M., Wilkinson, D., a Palková, Z. (2014). Global changes in gene expression associated with phenotypic switching of wild yeast. *BMC Genomics*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-136

Šťovíček, V., Váchová, L., Kuthan, M., a Palková, Z. (2010). General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genetics and Biology*, *47*(12), 1012–1022. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.005

Su, C., Yu, J., a Lu, Y. (2018). Hyphal development in Candida albicans from different cell states. *Current Genetics*, *64*(6), 1239–1243. https://doi.org/10.1007/s00294-018-0845-5

Takagi, J., Singh-Babak, S. D., Lohse, M. B., Dalal, C. K., a Johnson, A. D. (2019). Candida albicans white and opaque cells exhibit distinct spectra of organ colonization in mouse models of infection. *PLoS ONE*, *14*(6), 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218037

Tate, J. J., Cox, K. H., Rai, R., a Cooper, T. G. (2002). Mks1p is required for negative regulation of retrograde gene expression in Saccharomyces cerevisiae but does not affect nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(23), 20477–20482. https://doi.org/10.1074/jbc.M200962200

Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Köhler, J. R., Kadosh, D., a Lopez-Ribot, J. L. (2010a). Dispersion as an important step in the Candida albicans biofilm developmental cycle. *PLoS Pathogens*, *6*(3). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828

Uppuluri, P., Pierce, C. G., Thomas, D. P., Bubeck, S. S., Saville, S. P., a Lopez-Ribot, J. L. (2010b). The transcriptional regulator Nrg1p controls Candida albicans biofilm formation and dispersion. *Eukaryotic Cell*, *9*(10), 1531–1537. https://doi.org/10.1128/EC.00111-10

Váchová, L., Čáp, M., a Palková, Z. (2012). Yeast colonies: A model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/601836

Váchová, L., Chernyavskiy, O., Strachotová, D., Bianchini, P., Burdíková, Z., Ferčíková, I., Kubínová, L., a Palková, Z. (2009b). Architecture of developing multicellular yeast colony: Spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environmental Microbiology*, *11*(7), 1866–1877. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01911.x

Váchová, L., Devaux, F., Kučerová, H., Řičicová, M., Jacq, C., a Palková, Z. (2004). Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of Saccharomyces cerevisiae colonies. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(36), 37973–37981. https://doi.org/10.1074/jbc.M404594200

Váchová, L., Hatáková, L., Čáp, M., Pokorná, M., a Palková, Z. (2013). Rapidly developing yeast microcolonies differentiate in a similar way to aging giant colonies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*, 18–20. https://doi.org/10.1155/2013/102485

Váchová, L., Kučerová, H., Devaux, F., Úlehlová, M., a Palková, Z. (2009a). Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environmental Microbiology*, *11*(2), 494–504. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01789.x

Váchová, L., a Palková, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *Journal of Cell Biology*, *169*(5), 711–717. https://doi.org/10.1083/jcb.200410064

Váchová, L., a Palková, Z. (2011). Aging and longevity of yeast colony populations: Metabolic adaptation and differentiation. *Biochemical Society Transactions*, *39*(5), 1471–1475. https://doi.org/10.1042/BST0391471

Váchová, L., a Palková, Z. (2018). How structured yeast multicellular communities live, age and die? *FEMS Yeast Research*, *18*(4). https://doi.org/10.1093/femsyr/foy033

Váchová, L., a Palková, Z. (2019). Diverse roles of Tup1p and Cyc8p transcription regulators in the development of distinct types of yeast populations. *Current Genetics*, *65*(1), 147–151. https://doi.org/10.1007/s00294-018-0883-z

Váchová, L., Štoví, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubínová, L., a Palková, Z. (2011). Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *Journal of Cell Biology*, *194*(5), 679–687. https://doi.org/10.1083/jcb.201103129

Van Der Woude, M. W. (2006). Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiology Letters*, *254*(2), 190–197. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00038.x

Van Heusden, G. P. H., Griffiths, D. J. F., Ford, J. C., Chin-A-Woeng, T. F. C., Schrader, P. A. T., Carr, A. M., a Steensma, H. Y. (1995). The 14-3-3 Proteins Encoded by the BMH1 and BMH2 Genes are Essential in the Yeast Saccharomyces cerevisiae and Can be Replaced by a Plant Homologue. *European Journal of Biochemistry*, *229*(1), 45–53. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0045l.x

Van Nguyen, P., Hlaváček, O., Maršíková, J., Váchová, L., a Palková, Z. (2018). Cyc8p and Tup1p transcription regulators antagonistically regulate Flo11p expression and complexity of yeast colony biofilms. *PLoS Genetics*, *14*(7), 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007495

Van Nguyen, P., Plocek, V., Váchová, L., a Palková, Z. (2020). Glucose, Cyc8p and Tup1p regulate biofilm formation and dispersal in wild Saccharomyces cerevisiae. *npj Biofilms and Microbiomes*, *6*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41522-020-0118-1

van Rossum, H. M., Kozak, B. U., Niemeijer, M. S., Duine, H. J., Luttik, M. A. H., Boer, V. M., Kötter, P., Daran, J. M. G., van Maris, A. J. A., a Pronk, J. T. (2016). Alternative reactions at the interface of

glycolysis and citric acid cycle in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Research*, *16*(3), 1–13. https://doi.org/10.1093/femsyr/fow017

Varanasi, U. S., Klis, M., Mikesell, P. B., a Trumbly, R. J. (1996). The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(12), 6707–6714. https://doi.org/10.1128/mcb.16.12.6707

Velicer, G. J., Kroos, L., a Lenski, R. E. (1998). Loss of social behaviors by Myxococcus xanthus during evolution in an unstructured habitat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(21), 12376–12380. https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12376

Verstrepen, K. J., a Klis, F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, *60*(1), 5–15. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x

Vinod, P. K., Sengupta, N., Bhat, P. J., a Venkatesh, K. V. (2008). Integration of global signaling pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the regulation of FLO11. *PLoS ONE*, *3*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001663

Voordeckers, K., De Maeyer, D., van der Zande, E., Vinces, M. D., Meert, W., Cloots, L., Ryan, O., Marchal, K., a Verstrepen, K. J. (2012). Identification of a complex genetic network underlying Saccharomyces cerevisiae colony morphology. *Molecular Microbiology*, *86*(1), 225–239. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08192.x

Vopálenská, I., Hůlková, M., Janderová, B., a Palková, Z. (2005). The morphology of Saccharomyces cerevisiae colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. *Research in Microbiology*, *156*(9), 921–931. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.05.012

Vopálenská, I., Šťovíček, V., Janderová, B., Váchová, L., a Palková, Z. (2010). Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environmental Microbiology*, *12*(1), 264–277. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02067.x

Ward, M. P., Gimeno, C. J., Fink, G. R., a Garrett, S. (1995). SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(12), 6854–6863. https://doi.org/10.1128/mcb.15.12.6854

White, M. G., Piccirillo, S., Dusevich, V., Law, D. J., Kapros, T., a Honigberg, S. M. (2011). Flo11p adhesin required for meiotic differentiation in Saccharomyces cerevisiae minicolonies grown on plastic surfaces. *FEMS Yeast Research*, *11*(2), 223–232. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00712.x

Wile, D. B., a Wilding, J. P. H. (2014). CHAPTER 15 - Glucose metabolism and the pathophysiology of diabetes mellitus. In W. J. Marshall, M. Lapsley, A. P. Day, a R. M. Ayling (Ed.), *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects (Third Edition)* (Third Edition, s. 273–304). Churchill Livingstone. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5140-1.00015-8

Wilkinson, D., Maršíková, J., Hlaváček, O., Gilfillan, G. D., Ježková, E., Aaløkken, R., Váchová, L., a Palková, Z. (2018a). Transcriptome Remodeling of Differentiated Cells during Chronological Ageing of Yeast Colonies: New Insights into Metabolic Differentiation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/4932905

Wilkinson, D., Váchová, L., Hlaváček, O., Maršíková, J., Gilfillan, G. D., a Palková, Z. (2018b). Long

noncoding RNAs in yeast cells and differentiated subpopulations of yeast colonies and biofilms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/4950591

Wilson, W. A., Hawley, S. A., a Hardie, D. G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Current Biology*, *6*(11), 1426–1434. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(96)00747-6

Xiberras, J., Klein, M., a Nevoigt, E. (2019). Glycerol as a substrate for Saccharomyces cerevisiae based bioprocesses - Knowledge gaps regarding the central carbon catabolism of this „non-fermentable" carbon source. *Biotechnology Advances*, *37*(6), 107378. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.017

Xie, J., Tao, L., Nobile, C. J., Tong, Y., Guan, G., Sun, Y., Cao, C., Hernday, A. D., Johnson, A. D., Zhang, L., Bai, F. Y., a Huang, G. (2013). White-Opaque Switching in Natural MTLa/α Isolates of Candida albicans: Evolutionary Implications for Roles in Host Adaptation, Pathogenesis, and Sex. *PLoS Biology*, *11*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001525

Yang, L., Zheng, C., Chen, Y., Shi, X., Ying, Z., a Ying, H. (2019). Nitric oxide increases biofilm formation in Saccharomyces cerevisiae by activating the transcriptional factor Mac1p and thereby regulating the transmembrane protein Ctr1. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1359-1

Zara, G., Zara, S., Pinna, C., Marceddu, S., a Budroni, M. (2009). FLO11 gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology*, *155*(12), 3838–3846. https://doi.org/10.1099/mic.0.028738-0

Zikánová, B., Kuthan, M., Řičicová, M., Forstová, J., a Palková, Z. (2002). Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *294*(5), 962–967. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00589-2