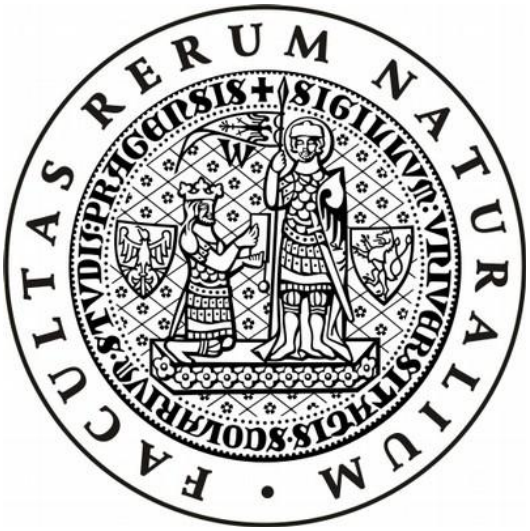
Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Molekulární mechanismy tvorby a vývoje kolonií přírodních kmenů *Saccharomyces cerevisiae*

Molecular mechanisms of formation and development of colonies of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains

Mgr. Vratislav Šťovíček

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha 2012

Prohlašuji, že tato práce byla vypracována samostatně s využitím řádně citovaných literárních zdrojů, pod vedením vedoucí práce a nebyla využita pro získání obdobného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne 27. 4. 2012

…….

Tato práce byla vypracována za podpory následujících grantů: GAČR 204/08/0718, SVV UK 265202 a MSM 0021620858.

věnováno památce PhDr. Vratislava Šťovíčka

Tato práce vznikla pod vedením prof. RNDr. Zdeny Palkové, CSc., které bych tímto velmi rád poděkoval za ochotu, trpělivost a vše dobré, co za dobu naší spolupráce vzniklo.

Doc. RNDr. Blance Janderové, RNDr. Libuši Váchové, CSc. díky za cenné rady a dalším spoluautorům jmenovitě RNDr. Lucii Kubínové, CSc., Mgr. Martinu Kuthanovi, PhD., Ing. Markétě Begany, Mgr. Ireně Vopálenské, Mgr. Alexandru Čerňavskému a Mgr. Luďku Štěpánkovi za jejich úsilí, bez něhož by tato práce nemohla vzniknout v aktuální podobě.

Mgr. Ditě Strachotové, Mgr. Michalu Čápovi a Mgr. Karlu Harantovi, se kterými spolupracuji vlastně od počátku své vědecké dráhy, bych chtěl věnovat poděkování a přání všeho nejlepšího do let budoucích.

RNDr. Blance Zikánové děkuji za léta strávená na praktiku z biologie kvasinek a za osobní i neosobní rady. Hance, Vlaďce a Saše pak za šikovné ruce a milý úsměv.

Všem dalším současným i bývalým kolegům z laboratoře, na něž se jmenovitě nedostalo, i když by si to určitě zasloužili, děkuji za jejich pomocnou ruku a kamarádský přístup nezbytný pro dobrou atmosféru v laboratoři.

Nekonečné a vřelé poděkování věnuji své rodině, zejména svým dvěma Evám a také Janince a její rodině. Tito moji nejbližší se společnými silami podíleli a podílejí na mém duševním i fyzickém zdraví a snad se jim to i uspokojivě daří.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK 6
ABSTRAKT 7
ABSTRACT 8
1. ÚVOD 9
2. CÍLE PRÁCE 10
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED 11
3.1. MNOHOBUNĚČNÁ SPOLEČENSTVA MIKROORGANISMŮ – PŘÍKLADY A VÝZNAM 12
3.1.1. BIOFILMY 13
3.1.2. KOLONIE 15
3.1.2.1. PŘEPÍNÁNÍ FENOTYPŮ 16
3.1.3. AGREGÁTY BUNĚK V KAPALNÉM PROSTŘEDÍ 18
3.1.4. PLODNICE 19
3.2. FAKTORY PODÍLEJÍCÍ SE NA VZNIKU MNOHOBUNĚČNÝCH ÚTVARŮ MIKROORGANISMŮ 20
3.2.1. EXTRACELULÁRNÍ MATRIX 21
3.2.1.1. EXTRACELULÁRNÍ POLYMERNÍ HMOTA BAKTERIÍ 22
3.2.1.2. EXTRACELULÁRNÍ MATRIX MNOHOBUNĚČNÝCH POPULACÍ KVASINEK 24
3.2.2. ADHEZIVNÍ VLASTNOSTI BUNĚK MIKROORGANISMŮ 26
3.2.2.1. BAKTERIÁLNÍ ADHEZIVNÍ MOLEKULY 27
3.2.2.2. ADHEZIVNÍ PROTEINY BUNĚČNÉ STĚNY KVASINEK 28
3.2.2.2.1. ADHEZIVNÍ PROTEINY *S. CEREVISIAE* 29
3.2.2.2.2. ADHEZIVNÍ PROTEINY PATOGENNÍCH KVASINEK *CANDIDA* sp. 31
3.2.3. DIFERENCIACE BUNĚČNÝCH POPULACÍ 32
3.2.3.1. MORFOLOGICKY ODLIŠNÉ BUŇKY PŘI VÝVOJI MNOHOBUNĚČNÝCH ÚTVARŮ 33
3.2.3.1.1. DIMORFISMUS U KVASINEK 33
3.2.3.2. PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT PŘI VÝVOJI POPULACÍ 35
3.2.3.3. POPULACE ODOLNÝCH BUNĚK V KONTEXTU MNOHOBUNĚČNÝCH ÚTVARŮ 37
3.2.3.4. OCHRANNÁ FUNKCE SPECIFICKÝCH BUNĚČNÝCH POPULACÍ 38
3.2.4. KOMUNIKAČNÍ MECHANISMY MIKROORGANISMŮ 39
3.2.4.1. QUORUM SENSING 39
3.2.4.1.1. QUORUM SENSING U BAKTERIÍ PŘI VÝVOJI MNOHOBUNĚČNÝCH POPULACÍ 40
3.2.4.1.2. QUORUM SENSING U KVASINEK 42
3.2.4.2. AMONIAK JAKO *LINGUA FRANCA* KVASINEK 43
3.3. GENETICKÉ DETERMINANTY VÝVOJE MNOHOBUNĚČNÝCH POPULACÍ KVASINEK 43
3.3.1. VÝVOJOVÉ DRÁHY U *S. CEREVISIAE* 44
3.3.2. SIGNÁLNÍ DRÁHY PODÍLEJÍCÍ SE NA VZNIKU BIOFILMŮ *C. ALBICANS* 46

3.4. Ztráta sociálních vlastností mikroorganismů 47
4. Materiál a Metody 49
4.1. Použitý biologický materiál 49
4.2. Výčet použitých metod 50
5. Výsledky 51
5.1. Mezibuněčné interakce a signály při vývoji strukturovaných kolonií 51
5.2. Obecné faktory přispívající k tvorbě strukturovaných kolonií 68
5.3. Vnitřní struktura kolonií a mechanismy podílející se na jejich ochraně 81
5.4. Genetické parametry fenotypové heterogenity přírodních kmenů kvasinek 96
6. Diskuse 128
7. Závěr 142
8. Seznam citované literatury 144

Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette – označení rodiny transportérů (a rovněž jejich specifické vazebné domény) využívajících energie vzniklé štěpením ATP k výkonu určité biologické funkce
AHL	acylated homoserin lactone – acylovaný homoserin lakton
AI-2	autoinducer 2 – autoinduktor 2
ALS	aglutinin like sequence – označení rodiny adhezivních proteinů podobných aglutininům
ATP	adenosine triphosphate – adenosin trifosfát
Bap	biofilm associated protein – protein potřebný pro tvorbu biofilmu
cAMP	cyclic adenosin-monophosphate – cyklický adenosin monofosfát
ECM	extracelullar matrix – extracelulární matrix
EPA	epithelial adhesin – označení rodiny adhezivních proteinů vázajících epitelia
EPS	extracelullar polymeric substance – extracelulární polymerní látka
FG	filamentous growth – vláknitý (filamentární) růst
FLO	flocculins – označení rodiny adhezivních proteinů - flokulinů
GPI	glykosylphosphatidylinositol – glykosylfosfatidylinositol
HAST	Hda1-affected subtelomeric domain – subtelomerické chromozomální oblasti ovlivňované specifickou deacetylasou Hda1p
HOG	high osmolarity glycerol – označení signální dráhy reagující na osmotický stres
kDa	kiloDalton – tisíce Daltonů
MAPK	mitogen activated protein kinase – mitogeny aktivovaná proteinkinasa
MDR	multidrug resistence – mnohočetná léková rezistence
MSCRAMM	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules – rodina mikrobiálních povrchových proteinů vazájících adhezivní molekuly tkáňové extracelulární matrix
PA14	protective antigen 14 – označení vazebné domény části toxinu bakterií antraxu
PCD	programmed cell death – programovaná buněčná smrt
PCR	polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
Pel	pellicle – označení polysacharidu esenciálního pro vznik bakteriálních povlaků
PIA	polysacharide intercellular adhesin – polysacharidový mezibuněčný adhezin
PGA	polyglutamic acid – polymer kyseliny glutamové
pKA	proteinkinase A – proteinkinasa A
pKC	proteinkinase C – proteinkinasa C
Psl	polysacharide synthesis locus – operon kódující syntézu stejnojmenného polysacharidu
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate - polyacrylamid gel electrophoresis – polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TOR	target of rapamycin – označení signální dráhy inhibovatelné rapamycinem
VPS	Vibrio polysacharide substance – extracelulární polysacharidové komponenty biofilmů bakterie *Vibrio* sp.

Abstrakt

Kvasinky jsou schopny tvořit širokou škálu mnohobuněčných útvarů, které umožňují přežívání populací v nehostinných a často se měnících podmínkách okolí. Příkladem takových společenství jsou útvary tvořící se na různých površích jako například biofilmy, spojené často s infekcemi v lidském těle, a kolonie. Tato práce se zabývá studiem vzniku a vývoje komplexních strukturovaných kolonií *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou charakteristickým rysem kmenů izolovaných ze svého přirozeného prostředí. Svou architekturou a vlastnostmi se zásadně liší od prostorově nediferencovaných kolonií většiny laboratorních kmenů a v mnoha ohledech naopak připomínají biofilmy patogenních kvasinek. Populace kvasinkových buněk využívají specifických vývojových procesů indukovaných komunikačními mechanismy k synchronizaci raných fází svého vývoje. Tvorba specifické trojrozměrné architektury kolonií je umožněna přítomností extracelulární hmoty a adhezivního proteinu Flo11p, jež se podílejí na stabilitě a integritě útvaru. Na ochraně kolonií se podílejí funkčně a prostorově diferencované populace buněk s využitím různých mechanismů jako je například přítomnost membránových pump odstraňujících toxické látky či produkce zmíněné extracelulární hmoty plnící rovněž funkci selektivně propustné bariéry. Charakteristickým rysem přírodních kmenů je rovněž fenotypová variabilita a ztráta typických vlastností při kultivaci v laboratorních podmínkách projevující se vznikem nediferencovaných kolonií. Za určitých podmínek může docházet k obnovení schopnosti tvorby strukturovaných kolonií. Repertoár takových změn ve fenotypu a mechanismů vedoucích ke vzniku útvarů výhodných pro existenci v nehostinných podmínkách může být rozsáhlejší. Projev některých specifických vlastností je pod kontrolou epigenetických mechanismů. Výsledky této práce prokazují, že vznik mnohobuněčných útvarů přírodních kmenů kvasinek skrývá řadu vlastností charakteristických pro mnohobuněčné organismy a zároveň představují komplexní strukturované kolonie jako dobrý model pro studium procesů zodpovědných za vysokou odolnost některých kvasinkových populací.

Klíčová slova: architektura kolonie, biofilm, diferenciace buněk, extracelulární matrix, fenotypová variabilita, Flo11p, kvasinkové kolonie, mnohočetná léková rezistence, přírodní kmeny, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Yeasts are capable of forming a wide range of multicellular communities, which enable the survival in harmful and changing environment. Surface associated biofilms, often connected with infections in human body, and colonies can serve as an example of such populations. This work investigates formation and development of complex structured colonies of *Saccharomyces cerevisiae*, which can be considered as a distinctive feature of yeast strains isolated from the wild. Architecture and properties of such colonies are fundamentally different from the spatially undifferentiated colonies of most of laboratory strains and resemble in many ways rather natural biofilms of pathogenic yeasts. Yeast populations use specific developmental processes induced by communication mechanisms to synchronize the early stages of their development. Formation of specific three-dimensional colony architecture is enabled by the presence of extracellular matrix and adhesive protein Flo11p which provide stability and integrity of the whole structure. Protection of the colonies is accomplished by spatially differentiated cell subpopulations using various mechanisms such as expression of efflux pumps capable of removing toxic substances or production of extracellular matrix functioning also as selectively permeable barrier. Phenotypic variability and loss of characteristic properties during prolonged cultivation under laboratory conditions resulting in emergence of smooth undifferentiated colonies are other features characteristic for wild yeast strains. However, these strains retain the ability to restore the formation of structured colonies and associated properties under certain conditions. The repertoire of such phenotypic changes and the mechanisms leading to formation of the life-style preferred in hostile environment may be more complex. Expression of some specific phenotypic properties is controlled by epigenetic mechanisms. Results of this work show that the formation of wild yeast strain communities involves many processes distinctive for the development of multicellular organisms and also present complex structured colonies as a powerful and tractable model for studying the processes responsible for high resistance of certain yeast populations.

Keywords: biofilm, cell differentiation, colony architecture, extracellular matrix, Flo11p, multidrug resistence, phenotypic variability, *Saccharomyces cerevisiae*, yeast colonies, wild strains

1. Úvod

Kvasinky, *Saccharomyces cerevisiae* především, jsou široce využívaným biologickým nástrojem provázejícím člověka po dlouhá staletí v řadě oblastí jeho činnosti. Díky některým vlastnostem jako je nenákladná a rychlá kultivace či snadná genetická manipulace se rovněž staly dobrým modelem pro studium základních procesů v eukaryotické buňce. Stejně jako celá řada dalších mikroorganismů však ani kvasinky nejsou pouhým laboratorním či biotechnologickým prostředkem, ale především živým organismem nacházejícím se v přírodě v prostředí a podmínkách, které jsou diametrálně odlišné od stabilních podmínek v laboratořích. Ve svém přirozeném prostředí se kvasinky víceméně nevyskytují jako individuální buňky, ale mají schopnost se sdružovat do organizovaných mnohobuněčných útvarů, které jim umožňují se s nástrahami nehostinného okolního prostředí účinně vyrovnávat. Taková společenstva nejsou pouhým homogenním shlukem buněk, ale vykazují řadu vlastností typických pro „vyšší“ mnohobuněčné organismy jako je funkční diferenciace a specializace jednotlivých buněčných populací či jejich vzájemná komunikace a kooperace.

Příkladem mnohobuněčných útvarů kvasinek, které pozorujeme u populací rostoucích na rozhraní dvou fází, jsou biofilmy a kolonie. Vznik heterogenních společenstev biofilmů pozorujeme zejména u patogenních kvasinek, kdy právě biofilmy porůstající tkáně či umělé materiály v těle člověka často slouží jako zdroj a rezervoár vážných infekcí. Kolonie jsou útvary tvořící se na pevném substrátu a jejich tvar je charakteristický pro daný rod, druh i kmen kvasinek. Většina laboratorních kmenů *S. cerevisiae* tvoří hladké, prostorově nepříliš diferencované útvary. Kolonie přírodních kmenů, jejichž studiem se zabývá tato práce, jsou však charakteristické svou komplikovanou trojrozměrnou strukturou připomínající řadou vlastností výše zmíněné biofilmy.

Vznik komplikovaných mnohobuněčných útvarů kvasinek je provázen vzájemným ovlivňováním, interakcemi a specifickými vlastnostmi buněčných populací. Jaké formy mezibuněčných interakcí a faktory, které je ovlivňují, se podílejí na vývoji komplexních strukturovaných kolonií? A které společné rysy a vlastnosti jsou charakteristické a zároveň nezbytné pro jejich tvorbu? To jsou hlavní otázky, na které se tato práce pokouší odpovědět.

Biofilmy a další mnohobuněčné útvary kvasinek jsou rovněž známy svou značnou rezistencí vůči široké škále chemických látek. Podstata tohoto jevu však není uspokojivě vysvětlena i kvůli nepříliš snadnému studiu biofilmů. Objasnit mechanismy podílející se na ochraně mnohobuněčných společenství kvasinek a ukázat kolonie přírodních kmenů jako dobrý model pro studium takových procesů je další z ambicí této práce.

Při delší kultivaci přírodních kmenů v laboratorních podmínkách dochází u části buněk v populaci ke změně fenotypu, ztrátě řady vlastností typických pro přírodní kmeny a zároveň ztrátě schopnosti tvorby strukturovaných kolonií. Takovéto tzv. domestikované kmeny si pak za stabilních podmínek udržují své fenotypové vlastnosti a tvoří prostorově nediferencované kolonie podobné laboratorním kmenům. Za jistých okolností lze však pozorovat znovuobnovení schopnosti tvorby strukturovaných kolonií. Poslední výzvou této práce je definovat vlastnosti takového systému a identifikovat molekulární faktory, které se na těchto změnách ve fenotypu podílejí.

2. Cíle práce

Hlavní cíle této disertační práce lze definovat v následujících bodech:

- Prostudovat vliv mezibuněčných interakcí a vláknitého růstu buněk na vznik a vývoj strukturovaných kolonií kvasinek *S. cerevisiae*.
- Identifikovat obecné fyziologické a molekulární faktory přispívající k vývoji a architektuře strukturovaných kolonií přírodních kmenů *S. cerevisiae*.
- Analyzovat vnitřní strukturu kolonií přírodních kmenů *S. cerevisiae* a definovat role různých buněčných populací při jejím vývoji a ochraně.
- Charakterizovat proces, při kterém dochází ke změnám ve fenotypu domestikovaných kmenů vedoucím k obnovení schopnosti tvorby strukturovaných kolonií a analyzovat možnou molekulární podstatu takových fenotypových změn.

3. Literární přehled

Výzkum mikroorganismů se v rámci tradičních mikrobiologických postupů zaměřuje převážně na homogenní populace individuálních, tzv. planktonních, buněk v čistých tekutých kulturách za optimálních a stabilních podmínek. Takový přístup je vhodný při studiu základních procesů odehrávajících se na úrovni jedné buňky. Většina mikroorganismů však ve svém přirozeném prostředí, kde jsou vystaveny nepříznivým a rychle se měnícím podmínkám, tvoří rozmanitou plejádu velmi komplexních mnohobuněčných útvarů (PALKOVÁ, 2004; WIMPENNY, 2009). Mnohobuněčná společenství nejsou pouze nahodilým a homogenním shlukem buněk, ale poměrně složitě prostorově a funkčně organizovanými útvary, kde dochází k procesům buněčné diferenciace, koordinace chování buněk a jejich vzájemné komunikace (CRESPI, 2001). Vznik a vlastnosti organizovaných mnohobuněčných společenství poskytují ve srovnání s planktonním způsobem života řadu výhod umožňujících přežívání populací v nehostinných podmínkách. Mnohobuněčné útvary zajišťují ochranu proti přítomnosti různých typů stresorů v okolí, umožňují schopnost zisku hůře dostupných živin a jejich efektivní utilizaci, tvorbu relativně stabilních mikroprostředí a v neposlední řadě rovněž zajišťují případné efektivní rozšiřování populace (MARKX et al., 2004). Velkou část svého života buňky mikroorganismů pravděpodobně skutečně stráví v mnohobuněčné formě, ovšem pro disperzi populace a obsazování nového prostředí je často nezbytné i jednobuněčné stádium. Střídání jedno - a mnohobuněčných forem je tedy typickým znakem životního stylu mikroorganismů (WIMPENNY, 2009). Nutno také dodat, že „vyšší“ mnohobuněčné organismy ve svém životním cyklu rovněž obsahují jednobuněčné stádium.

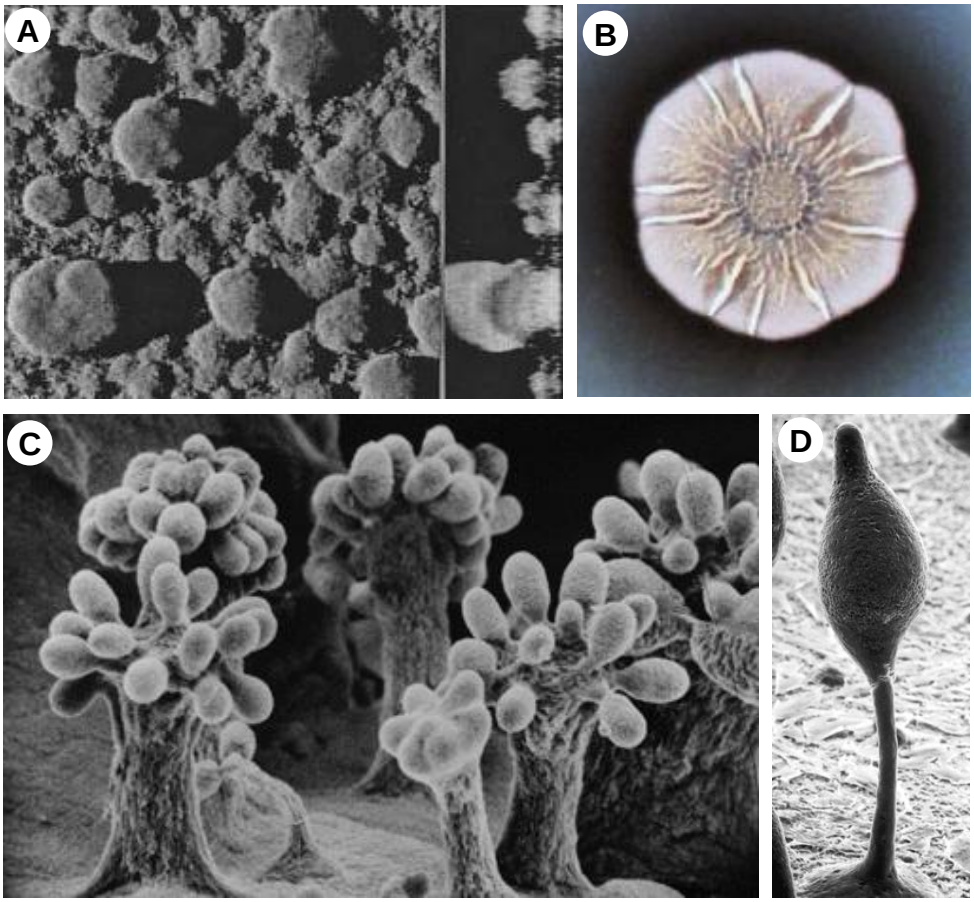
Kvasinky, vedle své již tradiční role biologického nástroje využívaného pro výrobu mnoha potravinářských i chemických produktů, slouží již po léta jako osvědčený model pro výzkum základních dějů v eukaryotické buňce. Schopnost tvorby mnohobuněčných útvarů, preferovaného životního stylu v přirozeném prostředí, si však také zaslouží pozornost a studium kvasinkových populací skutečně nabírá v posledních letech na intenzitě a zájmu mnoha vědeckých týmů.

Několik následujících kapitol se věnuje představení mnohobuněčných populací mikroorganismů a charakterizaci rysů a vlastností, které jsou pro ně typické a přispívají k jejich vzniku a vývoji. Řada faktorů a mechanismů je poměrně univerzální a nacházíme je jak u prokaryotických, tak eukaryotických mikroorganismů. Kvůli tomu a také vzhledem k faktu, že výzkum bakteriálních společenstev dospěl zatím mnohem dál než podobná

problematika u kvasinek, jsou zákonitosti bakteriálních a kvasinkových mnohobuněčných populací diskutovány převážně pohromadě.

3.1. Mnohobuněčná společenstva mikroorganismů – příklady a význam

Mnohobuněčné útvary zpravidla vznikají v reakci na podmínky vnějšího prostředí a často za specifickým účelem. Nejcharakterističtějším a asi nejrozšířenějším příkladem společenství mikroorganismů jsou biofilmy, populace buněk tvořící se na různorodých površích, či jejich různé varianty (GHANNOUM & O'TOOLE, 2004). Vedle toho ovšem nacházíme některé mikroorganismy sdružené do mnohobuněčných shluků i v kapalném prostředí (WIMPENNY, 2009) a ke konceptu mnohobuněčnosti mikroorganismů přispěly i specializované útvary, plodnice, tvořené zejména myxobakteriemi a eukaryotickými hlenkami (KAISER, 1986), dnes již tradičními modely výzkumu sociálního chování mikroorganismů (obr. 1) (FOSTER, 2010).



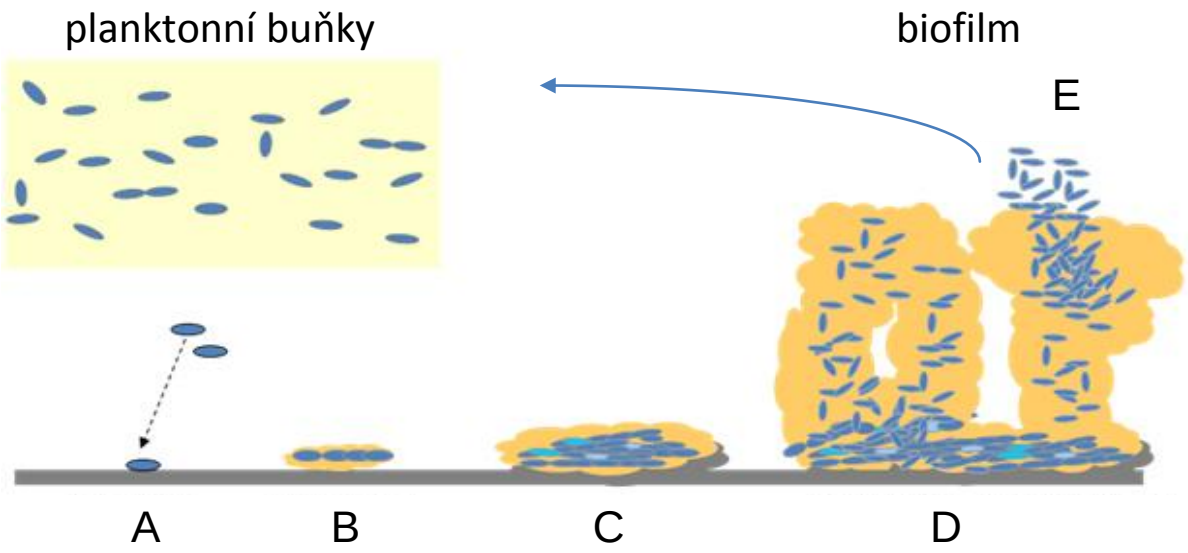
Obr. 1: Příklady mnohobuněčných útvarů mikroorganismů. A) Trojrozměrná projekce biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*, vpravo pohled z boku (KLAUSEN et al., 2003); B) kolonie přírodního kmene *Bacillus subtilis* (BRANDA et al., 2001); C) plodnice myxobakterie *Chondromyces crocatus* (GRILIONE & PANGBORN, 1975); D) plodnice hlenky *Dictyostelium discoideum*.

3.1.1. Biofilmy

Výzkum mikrobiálních populací se v současnosti zaměřuje především na biofilmy. Biofilmy lze definovat jako heterogenní společenstva přisedlá k biotickému či abiotickému substrátu, která obsahují masivní množství extracelulární hmoty (COSTERTON, 1999). V užším smyslu se za biofilmy považují útvary vznikající zpravidla na rozhraní pevného povrchu a kapaliny (DONLAN, 2002), výše zmíněnou obecnější definici však splňují jakékoliv útvary tvořící se na rozhraní libovolných skupenství. V tomto kontextu lze tedy za formu biofilmu považovat i níže diskutované populace kolonií, či povlaky na povrchu kapaliny. S biofilmy se můžeme v přírodě setkat takřka v libovolném prostředí a na libovolném povrchu, namátkou uveďme horniny v mořském i sladkovodním prostředí, těla rostlin a živočichů či půdní ekosystémy. Uvádí se, že téměř 80% všech bakterií se v přírodě vyskytuje ve formě přisedlých biofilmových populacích (DONLAN, 2002) a někteří autoři biofilmy označují za nejúspěšnější formu života na Zemi (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Na biofilmy narážíme rovněž v řadě oblastí lidské činnosti, a byť je lze častokrát využít, díky jejich absorpčním vlastnostem například při čištění odpadních vod (SINGH et al., 2006), způsobují převážně problémy jak v průmyslu, tak zejména v medicíně. Odhaduje se, že až 65% infekcí způsobených mikroorganismy u člověka je spojeno s biofilmy (DONLAN & COSTERTON, 2002). Značným problémem je také skutečnost, že ke vzniku biofilmů nedochází pouze na povrchu tkání, ale rovněž na cizorodých površích v lidském těle. Řada plastových náhrad a umělých katetrů se posléze stává vhodným substrátem pro vznik biofilmu, který slouží jako zdroj vážných infekcí (DONLAN, 2001; RAMAGE et al., 2006). Vzhledem ke svým vlastnostem jsou biofilmy často odolné vůči imunitnímu systému hostitele a několikanásobně rezistentnější k léčbě antibiotiky ve srovnání s planktonními buňkami (LEWIS, 2008; RAMAGE et al., 2010). Výzkum biofilmů je proto motivován objasněním dějů, které přispívají k vysoké odolnosti patogenních mikroorganismů s cílem vyvinout efektivní strategie k jejich eliminaci.

Vznik mikrobiálních biofilmů sdílí podobné fáze vývoje (obr. 2), ať již uvažujeme o bakteriích či kvasinkách. Iniciační fáze tvorby biofilmu je definována přiblížením buněk k povrchu substrátu a jejich adhezí. Poté dochází k efektivnímu buněčnému dělení, vytvoření bazálního povlaku buněk a počátku produkce extracelulární matrix (ECM). Extracelulární materiál odděluje a propojuje jednotlivé shluky buněk a podílí se na vzniku tzv. mikrokolonií. V průběhu maturace biofilmu dochází také díky masivnější produkci ECM k prostorové expanzi populace a vzniku typické vrstevnaté trojrozměrné architektury. Finální fází vývoje

biofilmů je jejich disperze a uvolnění buněk sloužící ke kolonizaci a rozšíření populace (BLANKENSHIP & MITCHELL, 2006; O'TOOLE et al., 2000).



Obr. 2: Vývojové fáze biofilmu. A) Adheze k substrátu; B) tvorba bazálního povlaku a začátek produkce ECM; C) tvorba mikrokolonií, počátek vzniku vrstevnaté architektury; D) maturace biofilmu, 3D expanze; E) disperze populace (upraveno z www.biotuesdays.com).

Vznik biofilmů a jejich struktura může být ovlivněna faktory vnějšího prostředí jako je teplota, vlastnosti substrátu, pH či tok kapaliny. Studium biofilmů je poměrně obtížné a informace lze získávat pouze z arteficiálních *in vitro* systémů, které však díky různým vlastnostem a podmínkám často nemohou poskytnout komplexní, konzistentní a reprodukovatelné výsledky (GHANNOUM & O'TOOLE, 2004). Tvorba biofilmů je z výše uvedených důvodů studována zejména u patogenních mikroorganismů, u bakterií typicky *Pseudomonas aeruginosa* kolonizující tkáně imunosuprimovaných pacientů (MA et al., 2009). U kvasinek je modelovým organismem pro studium biofilmů zejména nejběžnější lidský patogen *Candida albicans* (obr. 3A) (DOUGLAS, 2003), vznik biofilmů však pozorujeme i u dalších patogenních kvasinek *Cryptococcus neoformans* (MARTINEZ & CASADEVALL, 2006) či *Trichosporon asahii* (DI BONAVENTURA et al., 2006). Vlastnosti potřebné pro vznik biofilmů, např. adheze k abiotickému substrátu, rovněž splňuje jinak benigní kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (REYNOLDS & FINK, 2001), klinický či ekologický význam takových útvarů však nebyl prokázán. Běžnou situací v přírodních systémech jsou smíšené

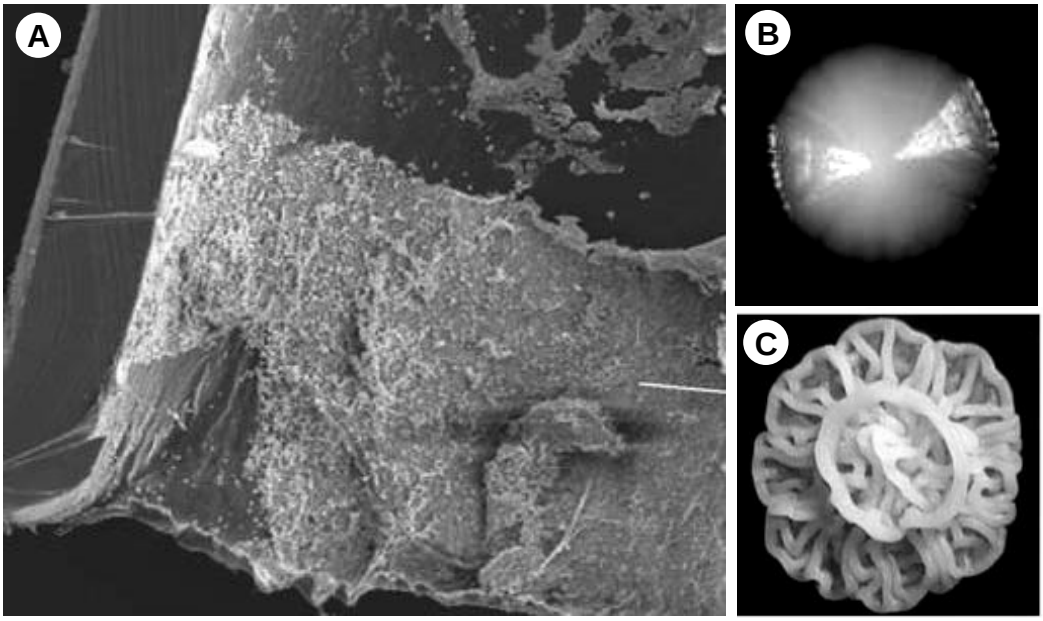
biofilmy, kde dochází k vzájemným vztahům různých mikroorganismů jako je kooperace, kompetice či predace, které mají vliv na strukturu a vývoj celého společenství (ELIAS & BANIN, 2012). Jako takové si smíšené biofilmy a jejich studium určitě zaslouží pozornost. Tato problematika však již přesahuje rozměr této práce.

3.1.2. Kolonie

Kolonie jsou společenstva mikroorganismů vznikající při růstu na pevném substrátu, v laboratořích zpravidla na agarovém médiu, na rozhraní se vzduchem. Přírodní populace bakterií i kvasinek tvoří na pevném povrchu často komplexní trojrozměrné kolonie obsahující určité množství extracelulární matrix (AGUILAR et al., 2007; PALKOVÁ, 2004) a v tomto kontextu je tedy můžeme považovat za jakousi prostorově definovanou obdobu biofilmu. Bakterie tvoří tvarově rozmanité útvary, kde dochází k vzájemné kooperaci buněk a jejich prostorové a funkční diferenciaci (BEN-JACOB et al., 1998), často v reakci na nepříznivé podmínky prostředí včetně přítomnosti různých typů stresorů (CHO et al., 2007). U některých bakterií dochází ke vzniku kolonií aktivním shlukováním pohyblivých buněk. Specifickým typem takových kolonií jsou tzv. hejna schopná aktivního pohybu po pevném povrchu (tzv. swarming motility) a kolonizace okolního prostředí (FRASER & HUGHES, 1999). Právě vznik kolonie je nezbytným předpokladem pro expanzi populace, kdy izolované buňky pohybu po agaru schopné nejsou a pohyb je tak kolektivním dílem celé populace (SHAPIRO, 1998). Tvar bakteriálních kolonií je ve stabilních podmínkách charakteristický pro daný druh a dokonce i kmen, je tak často využíván rovněž jako diagnostický a systematický znak, a může být značně ovlivněn byť jen nepatrnými změnami vnějších podmínek (AGUILAR et al., 2007).

Kolonie kvasinek jsou produktem růstu nepohyblivých buněk na povrchu pevného média. Jejich morfologie v podstatě splňuje charakteristiky vyřčené pro tvar a vzhled kolonií bakteriálních (PALKOVÁ, 2004). Běžně používané laboratorní kmeny kvasinek vytvářejí, až na výjimky, zpravidla kolonie hladké (obr. 3B), na druhou stranu kmeny izolované ze svých přirozených ekosystémů často tvoří prostorově heterogenní trojrozměrné útvary (dále nazývané strukturované kolonie, obr. 3C). Tvar kolonie a její architektura je rovněž ovlivnitelná kultivačními podmínkami, kdy například kolonie některých kmenů *S. cerevisiae* ztrácí svůj typický komplexní tvar při kultivaci na zkvasitelném zdroji uhlíku (GRANEK & MAGWENE, 2010) či vykazují extrémní expanzi ve vertikálním směru při růstu na zvýšené koncentraci agaru (SCHERZ et al., 2001). Naopak na snížené koncentraci agaru dochází ke vzniku širokých a plochých povlaků nazývaných „maty“ (REYNOLDS & FINK, 2001). Celá řada informací o struktuře a vlastnostech strukturovaných kolonií byla získána zejména při

studiu patogenních kvasinek *C. albicans* a *C. neoformans*. U různých izolátů těchto kmenů totiž velmi často dochází k fenotypové variabilitě projevující se tvorbou morfologicky odlišných typů kolonií, kdy si každý z fenotypů udržuje schopnost přecházet v jiný a *vice versa*. Tento fenomén byl nazván přepínání fenotypů (SLUTSKY et al., 1985).

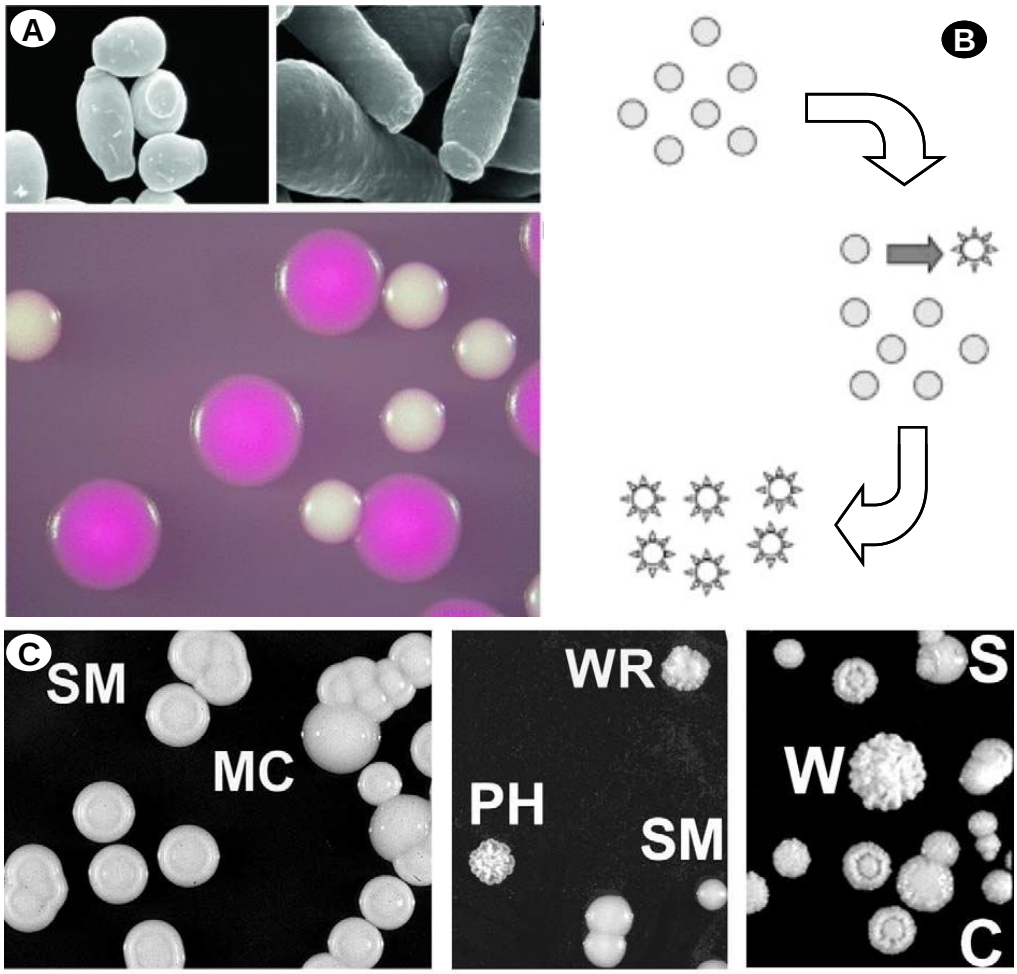


Obr. 3: Biofilmy a kolonie kvasinek. A) Biofilm *C. albicans* na vaskulárním katetru (NETT & ANDES, 2006); kolonie *S. cerevisiae*, B) laboratorní kmen, C) přírodní kmen (PALKOVÁ, 2004).

3.1.2.1. Přepínání fenotypů

Přepínání fenotypů je spontánní a reverzibilní proces, při kterém dochází, s frekvencí vyšší než je běžná mutační frekvence, ke vzniku fenotypových variant projevujících se změnami v morfologii kolonií (obr. 4). Schopnost náhodně měnit vlastnosti části populace se zdá být v kontextu mnohobuněčných společenství vyskytujících se ve svém přirozeném prostředí účinným adaptačním mechanismem. V nepředvídatelném a rychle se měnícím prostředí totiž „předpříprava" malého množství odlišných variant může zajistit flexibilní reakci populace a její přežití v podmínkách, které by pro homogenní populaci mohly být fatální (obr. 4B) (RAINEY et al., 2011). Schopnost přechodů mezi různými fenotypy je tedy efektivnější než adaptační možnosti buněk (např. vláknitý růst – viz kap. 3.2.3.1.1.) umožňující reakci na aktuální podmínky, která v proměnlivém prostředí nemusí být dostatečná (D'SOUZA & HEITMAN, 2001). Navzdory tomu, že je přepínání fenotypů často náhodné a dochází k němu i za konstantních podmínek, může být jeho frekvence specifickými faktory modulována či přímo vyvolávána (ALBY & BENNETT, 2009b; SOUSA et al., 2011). Změny v morfologii kolonií pochopitelně odrážejí celou řadu změn ve fyziologických a morfologických

charakteristikách buněk a mají v případě patogenních mikroorganismů za následek vznik virulentnějších a často velmi odolných fenotypů (GOLDMAN et al., 1998; JONES et al., 1994).



Obr. 4: Přepínání fenotypů. A) Nejprostudovanější přepínací systém „white-opaque“ *C. albicans*, nahoře zleva „white“ buňky a „opaque“ buňky, dole „white“ kolonie (bílé) a „opaque“ kolonie (růžové) na médiu s phloxinem B (MORSCHHÄUSER, 2010); B) model vzniku nových fenotypů, inokulace homogenní populace buněk – *in vivo* vznik nového fenotypu – proliferace odolnějšího a virulentnějšího fenotypu (JAIN et al., 2006); C) příklady přepínání fenotypů u různých kmenů *C. neoformans*, W/WR – vrásčité, S/SM – hladké, C – zoubkované, PH – pseudohyfální, MC – mukoidní (FRIES et al., 2002).

Přepínání fenotypů projevující se změnami v morfologii kolonií bylo zaznamenáno rovněž u celé řady patogenních i nepatogenních bakterií a zdá se být poměrně rozšířeným fenoménem (SOUSA et al., 2011). U kvasinek byl popsán zejména u patogenních druhů (obr. 4) *Candida* sp. (JAIN et al., 2008; SOLL, 1992), *C. neoformans* (GOLDMAN et al., 1998) či *T. asahii* (ICHIKAWA et al., 2004) a zajímavé je, že byl zaznamenán rovněž u virulentních izolátů jinak spíše nepatogenní kvasinky *S. cerevisiae* (CLEMONS et al., 1996). Nejznámější a rovněž neprostudovanější přepínací systém WO-1 spočívající v reverzibilních přechodech „white“ a

„opaque“ kolonií (SLUTSKY et al., 1987) má i další zajímavý význam vedle produkce rezistentního a virulentního fenotypu. Přepnutí na „opaque“ je totiž předpokladem pro proběhnutí konjugace buněk *C. albicans*, kdy pouze „opaque“ buňky jsou konjugace schopné. Přepínání fenotypů typu WO-1, a tedy zároveň pohlavní rozmnožování, je závislé na homozygositě v párovacím lokusu (LOCKHART et al., 2002). Takový výskyt je mezi klinickými kmeny poměrně řídký, což mimo jiné vysvětluje, proč nám párování u *C. albicans* zůstalo tak dlouho skryto (SOLL, 2004).

3.1.3. Agregáty buněk v kapalném prostředí

Řada mikroorganismů tvoří mnohobuněčné útvary i v kapalném prostředí. Vznik takových útvarů je závislý na specifických vlastnostech buněk umožňujících jejich vzájemnou adhezi a postupnou agregaci. Podobně jako je tomu u biofilmů i podstatnou část buněčných shluků tvoří extracelulární materiál, který vedle své strukturální role rovněž zásadním způsobem ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti populací (RASZKA et al., 2006). Schopnosti tvorby mikrobiálních agregátů v kapalném prostředí se velmi často využívá při biotechnologických procesech. Jednou z takových důležitých průmyslových aplikací je využití tzv. aktivovaného kalu při čištění odpadních vod. Aktivovaný kal je velmi různorodou směsí mnoha druhů organismů od bakterií, přes houbové mikroorganismy až po nálevníky. Biologické složky aktivovaného kalu jsou schopny absorbovat velká množství znečišťujících složek vody (organických polutantů, těžkých kovů) a případně je díky zvýšené lokální koncentraci příslušných enzymů efektivně degradovat. Další výhodou aktivovaného kalu je zvýšená rezistence vůči toxickým látkám a možnost snadného odstranění z vody filtrací (MINO, 2000).

Buňky kvasinek jsou schopny tvorby mnohobuněčných agregátů v průběhu procesu zvaném flokulace (obr. 5A). Jeho podstatou je převážně interakce povrchových adhezivních glykoproteinů se sacharidovými komponentami buněčné stěny adherujících buněk v závislosti na přítomnosti vápenatých iontů (VERSTREPEN & KLIS, 2006). Flokulační schopnosti jednotlivých kvasinek se mohou lišit v závislosti na genetickém pozadí. U *S. cerevisiae* můžeme proces rozdělit do několika kategorií podle jeho citlivosti k přítomnosti určitých sacharidů (MASY et al., 1992). Klasický, tzv. Flo1, typ je inhibován manosou, kdy tato funguje jako kompetitor vazby povrchových flokulinů. NewFlo typ flokulace je inhibován vedle manosy rovněž mnoha dalšími sacharidy (mimo jiné glukosou) a tohoto jevu se využívá zejména v pivovarnictví. Pivovarské kmeny díky svým vlastnostem tvoří agregáty buněk až po skončení fermentačního procesu, kdy se v okolí již nevyskytují žádné volné sacharidy a buňky sedimentují na dno fermentoru či povrch média, což usnadňuje jejich následné

odstranění (VERSTREPEN et al., 2003). Některé kmeny kvasinek vykazují flokulaci, která probíhá i v přítomnosti manosy a absenci vápenatých iontů (MASY et al., 1992). Tento typ adheze může být dán odlišnou specifitou flokulinů takových kmenů, využitím jiných adhezivních proteinů nebo nespecifickými interakcemi povrchů adherujících buněk (BAUER et al., 2010). Vedle biotechnologického využití flokulace má tato interakce i ekofyziologický význam pro organismus. Buňky *S. cerevisiae* produkující jeden z hlavních flokulinů Flo1p navzdory nižší reprodukční schopnosti tvoří mnohobuněčné agregáty, které jsou však odolné vůči některým stresovým faktorům (SMUKALLA et al., 2008).

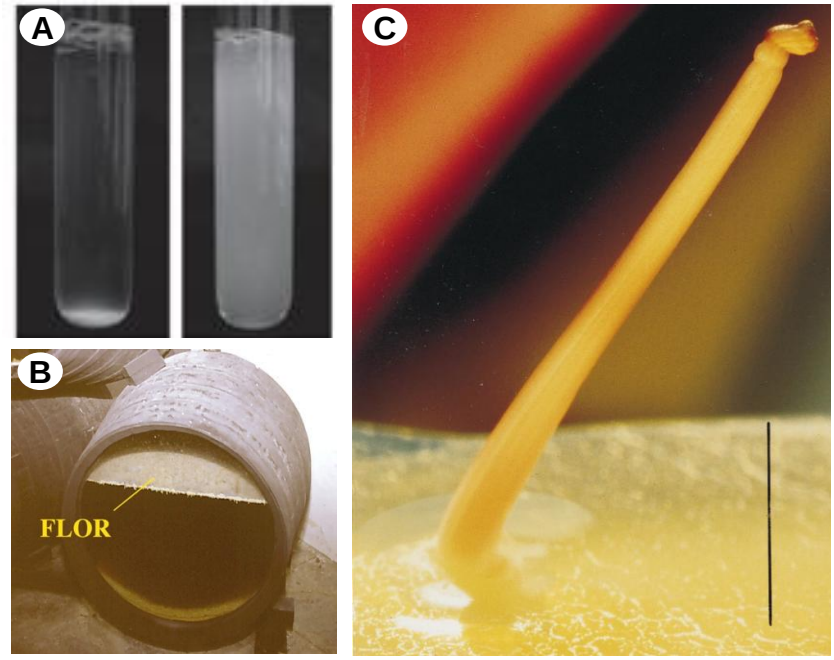
Mikroorganismy často tvoří mnohobuněčná společenstva na povrchu kapaliny. Takové chování často souvisí s vyčerpáním živin v médiu a slouží tedy jako mechanismus k zajištění přístupu populace ke kyslíku a umožnění aerobního metabolismu. Vznik těchto populací je závislý na schopnostech vzájemné adheze buněk a zároveň interakce s povrchem kapaliny, pravděpodobně na základě hydrofobicity buněčného povrchu (WIMPENNY, 2009). Takové povlaky buněk se u kvasinek nazývají „flor“ (španělsky květina) biofilmy (obr. 5B) a jejich vznik je charakteristický zejména pro vinařské kmeny kvasinek *S. cerevisiae* účastnící se procesu zrání sherry v dubových sudech. Tyto kmeny tvoří po skončení fermentace na povrchu vína blanku, v aerobním prostředí metabolizují ethanol na acetaldehyd a dodávají pak vínu specifické chuťové vlastnosti (ESTEVE-ZARZOSO et al., 2001). Schopnost tvorby „flor“ biofilmů je vždy závislá na expresi specifických povrchových adhezivních proteinů (ISHIGAMI et al., 2004) a setkáme se s ní i u kmenů, které běžně víno nezušlechťují, ale extenzivní oxidací ho kazí a je tedy primárně obecným mechanismem kvasinek adaptovaných na specifické prostředí (NAKAGAWA et al., 2011).

3.1.4. Plodnice

Některé mikroorganismy tvoří v reakci na nepříznivé podmínky prostředí mnohobuněčné útvary – plodnice. Plodnice jsou specializované buněčné agregáty, uvnitř kterých dochází ke vzniku rezistentních a metabolicky neaktivních spor. Díky své specifické trojrozměrné struktuře slouží plodnice rovněž k elevaci spor nad úroveň substrátu, jejich účinnou disperzi a tím rozšíření populace do nového prostředí (CRESPI, 2001). Tvorba plodnic je důležitým krokem v životním cyklu myxobakterií (SHIMKETS, 1990) a sociální hlenky *D. discoideum* (DAO et al., 2000). Vzhledem k buněčné diferenciaci a kooperaci odehrávající se při jejich tvorbě a vývoji jsou plodnice typickým a široce studovaným příkladem mnohobuněčného chování mikroorganismů (FOSTER, 2010). Plodnicím podobné útvary se tvoří i na povrchu

biofilmů a kolonií *B. subtilis*, kde tyto plní zřejmě totožnou funkci jako plodnice myxobakterií a hlenek, tedy elevaci spor a jejich efektivní disperzi (BRANDA et al., 2001).

Kvasinky i některé bakterie jsou schopny v reakci na UV záření tvořit makroskopické stopkaté útvary (obr. 5C). Podmínky jejich vzniku jsou sice poněkud arteficiální (zvýšená koncentrace agaru, provzdušněné a vysušené médium), k jejich tvorbě však dochází reprodukovatelně a s určitými odlišnostmi i u různých druhů mikroorganismů. Jak morfologicky, tak funkčně se tyto podobají opět výše zmíněným plodnicím, kdy u sporulujících druhů dochází ve špičce stopek k tvorbě spor (ENGELBERG et al., 1998).



Obr. 5: Společenstva kvasinek. A) Vlevo flokulující kmen *S. cerevisiae* tvořící sediment na dně zkumavky, vpravo neflokulující kultura (BRÜCKNER & MÖSCH, 2011); B) „flor“ biofilm vinařských kmenů (FIDALGO et al., 2006); C) stopkatý útvar *S. cerevisiae* (ENGELBERG et al., 1998)

3.2. Faktory podílející se na vzniku mnohobuněčných útvarů mikroorganismů

Vznik a vývoj mnohobuněčných útvarů mikroorganismů je umožněn přítomností řady procesů, které často nelze pozorovat na úrovni individuálních buněk. Adhezivita buněk, produkce extracelulární hmoty, diferenciace odlišných buněčných populací jsou výčtem právě takových vlastností typických pro mnohobuněčné populace mikroorganismů a jejich detailnější rozbor je náplní následujících kapitol.

3.2.1. Extracelulární matrix

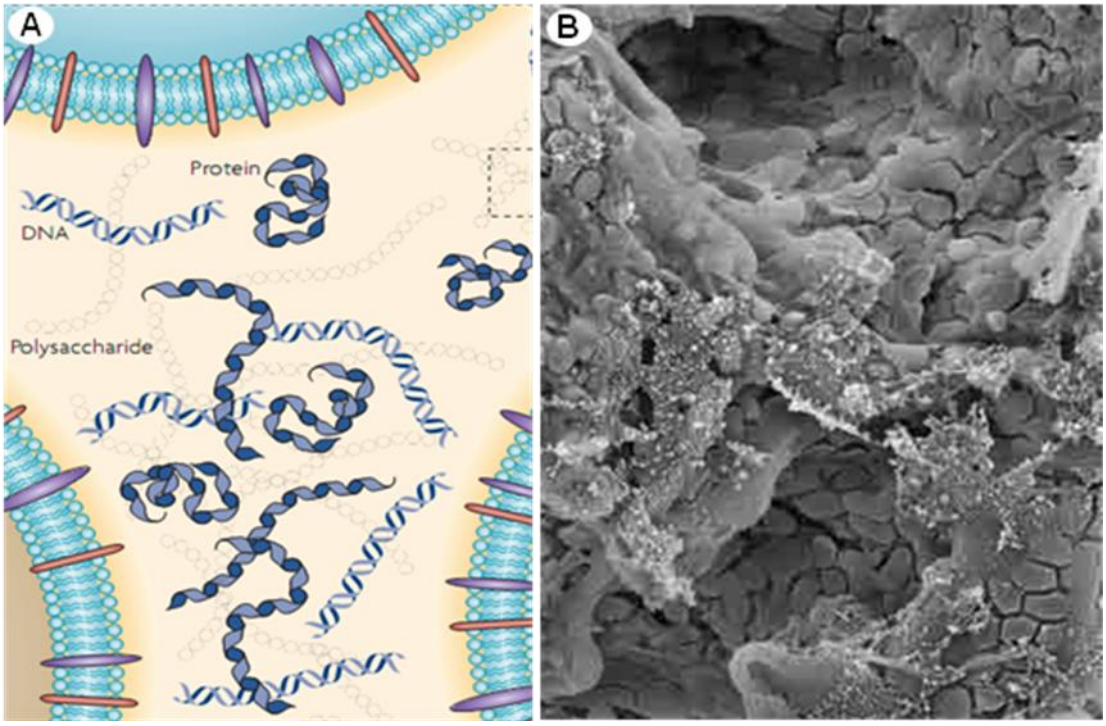
Extracelulární matrix je známa především jako nebuněčná složka tkání živočichů, která poskytuje mechanickou oporu buňkám jednotlivých tkání. Zároveň slouží jako propojující element a plní tak nezbytnou úlohu rovněž v mezibuněčné komunikaci. Extracelulární hmota obalující a propojující buňky mikroorganismů v rámci mnohobuněčných útvarů je charakteristickým rysem většiny přírodních mikrobiálních populací, kdy může tvořit až 90% veškeré hmoty útvaru (DONLAN, 2002). Složení a struktura ECM je značně heterogenní. Je složena zejména z biopolymerních látek, avšak značně se liší, podobně jako struktura jednotlivých útvarů, v závislosti na vnějších podmínkách, druhu mikroorganismu a dokonce také mezi různými kmeny daného druhu. Na tvorbě mimobuněčné hmoty se podílejí komponenty buněčného povrchu daného organismu a často není možné jednoznačně definovat, co je ještě integrální součástí buňky a co se nachází vně. Extracelulární matrix je tak jakousi „prodlouženou rukou" buněčného povrchu a složky buněčné stěny, např. kovalentně vázané proteiny jsou často nezbytné pro vznik, konsolidaci a stabilizaci ECM (FLEMMING & WINGENDER, 2010). V tomto kontextu a širším úhlu pohledu je tedy potřeba jako složky ECM, podobně jako je tomu u vyšších eukaryot, brát v potaz i integrální součásti buňky (BRANDA et al., 2005).

Vzhledem k neexistenci univerzální metody izolace a výše zmíněné provázanosti ECM s buněčným povrchem je přesné složení a definice struktury u řady mikroorganismů spíše velkou neznámou. Nesnadná experimentální uchopitelnost rovněž znesnadňuje přímé prokázání její role v mnohobuněčných populacích. ECM si vysloužila přezdívku „temná hmota", kdy je jí přisuzována celá řada funkcí a vlastností, které jsou často více či méně spekulativní (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Čím dál více je však zřejmé, že ECM je nezbytná pro prostorovou a funkční heterogenitu mnohobuněčných populací, kdy se podílí především díky svým adhezivním vlastnostem na mechanické stabilitě jednotlivých shluků buněk, zároveň je odděluje a propojuje mezi sebou za vzniku až komplexních trojrozměrných útvarů vykazujících typickou pórovitou strukturu (obr. 6) (DOUGLAS, 2003; LOPEZ et al., 2010). To může umožňovat efektivní rozvod různých živin, metabolitů či signálních a odpadních látek. Působí též jako bariéra chránící útvar před vnějším stresem (např. vysycháním či UV zářením) a imunitním systémem hostitele. Současně brání průniku cizorodých látek dovnitř útvaru a v případě patogenních mikrobů se tak může podílet na vysoké odolnosti populací a jejich rezistenci vůči jinak efektivní léčbě antibiotiky. Díky svým absorpčním vlastnostem se ECM podílí na zadržování vody a jiných živin z prostředí, může

přispívat ke zvýšené prostorové koncentraci enzymů umožňující efektivní utilizaci potravních zdrojů či sama o sobě sloužit jako zdroj sacharidů, aminokyselin či dalších látek, ze kterých je složena (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

3.2.1.1. Extracelulární polymerní hmota bakterií

Nejvýznamnější složkou extracelulární matrix bakteriálních populací jsou polysacharidy. Původně byly považovány za téměř výhradní komponentu ECM, a proto se pro ni vžil název „extracelulární polysacharidová látka“ (extracellular polysaccharide substance). S přibývajícími znalostmi se ovšem ukázalo, že významnou součástí ECM mohou být i další látky jako např. proteiny, DNA či lipidy (obr. 6), kdy např. proteiny v některých případech mohou být složkou majoritní. Název byl tedy elegantně změněn na extracelulární polymerní látku (extracellular polymeric substance) a ustálená zkratka EPS je používána dál (BRANDA et al., 2005).



Obr. 6: Extracelulární matrix. A) Schématické znázornění polymerů (polysacharidy, proteiny, DNA) vyplňujících mezibuněčný prostor (FLEMMING & WINGENDER, 2010); B) elektron mikroskopický snímek biofilmu *Salmonella enterica*, patrné značné množství ECM obalující buňky (ANNOUS et al., 2009).

ECM mnohobuněčných populací mnoha druhů bakterií je tvořena homopolymerem glukosy – celulosou. Celulosa je nezbytná pro tvorbu biofilmů a strukturovaných („vrásčitých“) kolonií *Salmonella* spp. a *Escherichia coli*, kdy mutanty neschopné produkce celulosové matrix netvoří biofilmy na abiotických substrátech, jejich kolonie jsou hladké a

postrádají zřetelnou prostorovou diferenciaci (ZOGAJ et al., 2001). Vedle toho celulosová matrix rovněž může sloužit jako ochrana proti vysychání (WHITE et al., 2006), či zajišťovat biologickou a mechanickou ochranu proti vlivům vnějšího prostředí u mnoha dalších druhů bakterií (ROSS et al., 1991). Jiný homopolymer tzv. PIA polysacharid (polysaccharide intercellular adhesin) – kladně nabitý polymer β-1,6 N-acetylglukosaminu – plní mezibuněčnou adhezivní funkci a zajišťuje tak strukturní integritu biofilmu *Staphyloccocus* spp. (O'GARA, 2007). Zároveň může zastávat i protektivní funkci, kdy zajišťuje ochranu proti buňkám imunitního systému hostitele (BEGUN et al., 2007). PIA nebo jeho deriváty se účastní tvorby biofilmů i jiných druhů bakterií např. *E. coli* (WANG et al., 2004) či *Yersinia pestis* (JARRETT et al., 2004).

Většina polysacharidových matrix je však složena z heteropolymerů, tedy polymerů několika různých sacharidů a velmi často se liší i mezi kmeny příslušného druhu bakterie. Klinické izoláty bakterie *P. aeruginosa* produkují alginát jako komponentu potřebnou pro počáteční fázi vývoje biofilmu a také mechanickou stabilitu maturovaných biofilmů. Alginát také přispívá ke zvýšené rezistenci biofilmů k antibiotikům a obranným mechanismům hostitele (RYDER et al., 2007). Jiné kmeny *P. aeruginosa* však alginát neprodukují a jejich matrix je složena z jiných polysacharidů Pel – obsahuje zejména glukosu a Psl – obsahuje manosu, glukosu a rhamnosu. Tyto složky plní podobnou funkci jako alginát, kdy Pel je nezbytný pro tvorbu biofilmu na rozhraní voda/vzduch, vznik strukturovaných kolonií (FRIEDMAN & KOLTER, 2004) a účastní se též ochrany proti antibiotikům (COLVIN et al., 2011). Psl se účastní adheze buněk k povrchu a ovlivňuje tak iniciační fázi vývoje biofilmu, zároveň zabezpečuje mezibuněčnou adhezi a tedy integritu maturovaného biofilmu (MA et al., 2009).

Velmi heterogenní směs sacharidů obsahujících mimojiné polymery glukosy, galaktosy, N-acetylglukosaminu a manosy nazvaná VPS (Vibrio polysaccharide substance) je nezbytná pro tvorbu biofilmů a strukturovaných kolonií *Vibrio cholerae* a jejich rezistenci vůči různým stresovým faktorům (WAI et al., 1998; YILDIZ & SCHOOLNIK, 1999). Komplexní směs polysacharidů obsahují rovněž mohutné biofilmy a trojrozměrné strukturované kolonie *B. subtilis* (LOPEZ et al., 2010; MARVASI et al., 2010).

Vedle polysacharidů najdeme často jako významnou složku ECM také proteiny, kdy někdy jejich hmota může významně převážit celkový obsah sacharidů (LIU & FANG, 2002; SHENG et al., 2005). Role proteinů při tvorbě matrix a vývoji biofilmu je často nezastupitelná, kdy se podílejí zejména díky svým adhezivním vlastnostem na vzniku a konsolidaci biofilmu. Pro příklad uveďme extracelulární protein Tas, který se podílí společně s polysacharidy na

tvorbě extracelulární matrix u *B. subtilis* (BRANDA et al., 2006), či u jiných kmenů polymer glutamátu (PGA) (STANLEY & LAZAZZERA, 2005). Bap proteiny se podílí na tvorbě biofilmu *Staphylococcus* sp., kdy u některých kmenů není potřebná další produkce exopolysacharidových složek (CUCARELLA et al., 2004). Společně se strukturními proteiny jsou součástí matrix také enzymy, které slouží díky své koncentraci v určitých místech k efektivnímu využívání potravních zdrojů, či natrávení matrix a disperzi biofilmu (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

Strukturní úlohu v ECM může plnit rovněž DNA, která je významnou složkou v biofilmech *P. aeruginosa* (WHITCHURCH et al., 2002) či *S. aureus* (RICE et al., 2007). DNA by mohla rovněž představovat ochranou bariéru, kdy je součástí matrix biofilmu *Bacillus cereus* a její přítomnost zvyšuje resistenci vůči aktinomycinu D (VILAIN et al., 2009). Lipidy, lipoproteiny či lipopolysacharidy jsou často také součástí matrix mnoha mnohobuněčných útvarů bakterií, kdy významnou měrou přispívají ke změně povrchových vlastností mnohobuněčných komunit a umožňují jejich adhezi k jinak nepřístupným povrchům (FLEMMING & WINGENDER, 2010) nebo mohou dokonce sloužit jako signální molekuly (KOLTER, 2010).

3.2.1.2. Extracelulární matrix mnohobuněčných populací kvasinek

Podobně jako u bakterií je ECM neodmyslitelnou součástí většiny mnohobuněčných populací kvasinek a je složena z polymerů sacharidového či proteinového charakteru. Složení, struktura a přesná funkce extracelulární matrix v mnohobuněčných společenstvech kvasinek je poměrně velkou neznámou. Nejvíce informací ohledně složení a možné funkci extracelulární matrix je k dispozici zejména díky studiu biofilmů patogenních kvasinek *Candida* sp. (obr. 7) a to zejména z důvodů její potenciální role v rezistenci vůči antimykotickým látkám (D'ENFERT, 2006). ECM biofilmů *Candida* sp. je velmi komplexní směsí převážně polysacharidů (zejména na bázi glukosy), jejich derivátů jako jsou hexosaminy či kyselina uronová, proteinů (BAILLIE & DOUGLAS, 2000) a také DNA (MARTINS et al., 2010). Složení se liší mezi jednotlivými druhy kvasinky, kdy například matrix biofilmů *C. albicans* je složena převážně z polymeru glukosy β-1,3 glukanu, zatímco v biofilmech *C. tropicalis* tvoří majoritní složku N-acetylglukosamin (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2006).

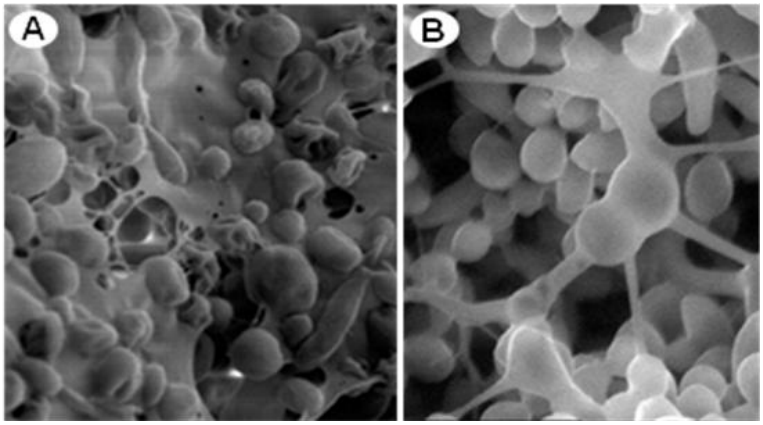
Pokud je biofilm vystaven proudu kapaliny, dochází k masivnější produkci ECM a změnám ve stavbě a architektuře biofilmu ve srovnání s biofilmy statickými, což prokazuje strukturní roli ECM na tvorbě biofilmu a zajištění jeho integrity (BAILLIE & DOUGLAS, 2000). První studie zaměřující se na podíl ECM v rezistenci biofilmů *C. albicans* vůči

antimykotickým látkám neprokázaly, že by masivní produkce ECM zamezovala průniku některých antimykotických látek dovnitř biofilmu a zodpovídala tak za jeho zvýšenou rezistenci (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2004; BAILLIE & DOUGLAS, 2000). Jiná studie této laboratoře využívající odlišný model kultivace biofilmu ukazuje, že při určitých podmínkách dochází k dostatečné produkci ECM, která zvyšuje rezistenci takto indukovaných biofilmů k amfotericinu B. Rezistenci vůči antimykotikům nezajišťuje pouze zvýšené množství ECM, ale také její složení, kdy biofilmy *C. tropicalis* obsahující polymer N-acetylglukosaminu, či smíšené biofilmy *C. albicans* s bakterií *S. aureus*, jejíž matrix je tvořena PIA polysacharidem (viz kap. 3.2.1.1.) vykazují vyšší resistenci ve srovnání s biofilmy samotné *C. albicans* (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2006). Jako složka ECM skutečně zadržující antimykotické látky a zodpovědná za zvýšenou rezistenci biofilmu *C. albicans* vůči flukonazolu byl identifikován β-1,3 glukan (NETT et al., 2007). Jeho produkce je závislá na funkci hlavní glukanasy Fks1p (NETT et al., 2010) a některých členů PKC dráhy (NETT et al., 2011), která aktivitu glukanasy reguluje, kdy mutanty v těchto genech sice jsou schopny tvořit biofilm produkující ECM, jsou však výrazně citlivější vůči široké škále azolových antimykotik. Glukan tedy není esenciální strukturní složkou ECM biofilmů, díky svému potenciálu zadržovat cizorodé látky je však nezbytný pro vysokou rezistenci biofilmů *C. albicans*.

I v biofilmech kvasinek, podobně jako u bakterií může hrát strukturní roli DNA (MARTINS et al., 2010). Zajímavé je zjištění, že přidání DNasy zvyšuje citlivost biofilmu vůči některým látkám a byť není pravděpodobné, že by DNA zabraňovala průniku cizorodých látek k buňkám, může se podílet na rezistenci jiným mechanismem (MARTINS et al., 2012).

Značné množství ECM nacházíme i v koloniích *Candida sp.* (WHITTAKER & DRUCKER, 1970), kdy její zvýšenou produkci lze zaznamenat zejména u strukturovaných variant kolonií (FRANCA et al., 2011). Exopolysacharidová matrix je rovněž přítomná v biofilmech jiné patogenní kvasinky *C. neoformans* (MARTINEZ & CASADEVALL, 2006) a má vliv na architekturu strukturovaných („vráskčitých“) kolonií (GOLDMAN et al., 1998).

Různá mnohobuněčná společenství kvasinky *S. cerevisiae* jsou rovněž charakterizována přítomností ECM. Strukturované kolonie přírodních kmenů *S. cerevisiae* obsahují značné množství ECM (obr. 7), jejíž významnou složkou by mohla být i proteinová komponenta. Extrakty takových kolonií totiž obsahují vysokomolekulární protein, který není patrný v hladkých koloniích laboratorních kmenů, které ECM neprodukují či pouze v zanedbatelném množství (KUTHAN et al., 2003). Tzv. „maty“, tedy koloniální povlaky, rostoucí na snížené koncentraci agaru, produkují fluidní matrix, jejíž významnou složkou je adhezivní protein buněčné stěny Flo11p. Zde je však tento protein uvolňován ze stěny buněk a plní spíše



Obr. 7: Extracelulární matrix kvasinkových populací. A) Elektronmikroskopický snímek biofilmu *C. albicans* (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2006), B) elektronmikroskopický snímek povrchu strukturovaných kolonií přírodního kmene *S. cerevisiae* BR-F (KUTHAN et al., 2003).

lubrikační funkci, pravděpodobně vyvazováním ligandů na povrchu média, která má za následek rozšiřování populace po povrchu substrátu (KARUNANITHI et al., 2010). ECM také tvoří součást populací buněk „flor" kmenů *S. cerevisiae* rostoucích ve formě biofilmů na povrchu zrajícího sherry (ZARA et al., 2009). Flokulující buňky *S. cerevisiae* produkující povrchový adhezivní protein Flo1p jsou obaleny v extracelulární hmotě, která je složena převážně z polymerů glukosy a manosy. Tato ECM neposkytuje populacím zvýšenou rezistenci vůči některým stresovým látkám, je však schopna bránit průniku některých větších, např. proteinových, molekul dovnitř buněčného shluku (BEAUVAIS et al., 2009).

Na příkladech z kvasinkového světa lze tedy směle demonstrovat teze vyřčené na začátku této kapitoly. ECM je významnou součástí široké škály mnohobuněčných populací, má velmi heterogenní složení a může plnit rozličné funkce v závislosti na druhu organismu, dané populaci a specifických podmínkách.

3.2.2. Adhezivní vlastnosti buněk mikroorganismů

Kritickou vlastností buněk mnohobuněčných populací mikroorganismů je jejich schopnost adheze. Vznik řady útvarů je závislý na vzájemné adhezi buněk, v případě populací vyvíjejících se na rozhraní dvou fází (de facto nejběžnější životní styl mikroorganismů v přirozeném prostředí) zároveň na adhezi buněk k biotickému či abiotickému povrchu. Adhezivní vlastnosti buněk jsou v případě patogenních mikroorganismů také klíčové pro úspěšnou kolonizaci tkáně hostitele (DRANGINIS et al., 2007; KLINE et al., 2009).

Adhezivita buněk může být zprostředkována nespecificky hydrofobními či elektrostatickými interakcemi mezi buněčným povrchem, jeho bezprostředním okolím a substrátem. Specifická adheze je zprostředkována molekulárními faktory vnější vrstvy buněčné stěny či extracelulární matrix. Zjednodušeně se předpokládá, že adheze buněk na neživý substrát je nespecifickou interakcí dvou adherujících povrchů, která je dána jejich

fyzikálně chemickými vlastnostmi. Mezibuněčná adheze a adheze na biotický povrch je pak zprostředkována právě specifickými adhezivními molekulami na povrchu mikrobiálních buněk (DUNNE, 2002).

3.2.2.1. Bakteriální adhezivní molekuly

Bakterie využívají pro adhezi polysacharidové, lipopolysacharidové či proteinové povrchové struktury, které mohou přispívat k nespecifickým adhezivním vlastnostem buněčného povrchu (např. zvyšováním hydrofobicity) či se specificky vázat na jiné molekuly v okolí. Například adheze na povrch tkáně může být zprostředkována přes komponenty extracelulární matrix hostitele nebo mohou adhezivní molekuly sloužit jako ligandy receptorům na membráně hostitelských buněk (KLINE et al., 2009). Multimerní proteinové útvary jako jsou bičíky, fimbrie a jim podobné pily a curli (kadeře) slouží mimo jiné primárně k pohybu či konjugaci. Tyto útvary jsou vedle toho využívány pro svoje adhezivní vlastnosti zejména k iniciační fázi tvorby biofilmů, ale účastní se rovněž mezibuněčné adheze, podílejí se na stavbě ECM a tím zajišťují také růst a integritu biofilmu (DUNNE, 2002).

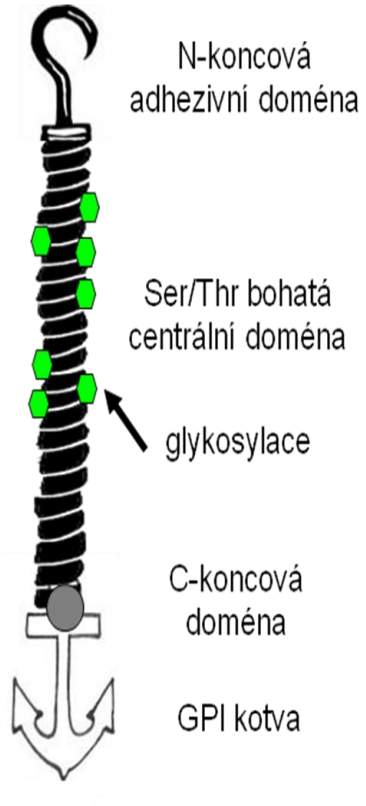
Bičíky jsou u některých pohyblivých bakterií za určitých podmínek nezbytné pro vznik mnohobuněčných populací. Jsou využívány zejména k přiblížení buňky k povrchu a překonání odpudivých sil mezi buňkou a povrchem, spíše než pro svou vlastní adhezivní funkci (O'TOOLE & KOLTER, 1998; WATNICK & KOLTER, 1999). Pilus typu IV se účastní adheze k živému i neživému substrátu (GILTNER et al., 2006), kmeny *P. aeruginosa* postrádající pilus nejsou schopny tvorby biofilmu na umělých površích (O'TOOLE & KOLTER, 1998). Zjistilo se také, že pilus může vázat extracelulární DNA (VAN SCHAIK et al., 2005). Vzhledem k tomu, že DNA plní strukturální funkci v ECM biofilmu, mohl by pilus hrát rovněž roli v zajištění mechanické stability biofilmu jako spojka mezi extracelulární DNA a buňkou (VAN SCHAIK et al., 2005). Jiné vlasovité povrchové struktury CupA fimbrie se rovněž podílejí na vzniku biofilmu *P. aeruginosa* (VALLET et al., 2001), vedle toho také pravděpodobně hrají roli v mezibuněčné adhezi maturovaného biofilmu a jsou nezbytné pro tvorbu „vrásčitých“ kolonií (D'ARGENIO et al., 2002). Fimbrie typu I zprostředkovávají vazbu na povrch eukaryotické buňky, kdy mohou vázat komponenty matrix hostitele, či být přímo ligandem receptoru eukaryotické buňky (KLINE et al., 2009). Jsou významné pro vznik biofilmů *E. coli* na umělých površích i povlaků na rozhraní kapaliny a vzduchu (PRATT & KOLTER, 1998; WRIGHT et al., 2007). Zvláštní typ adhezivních povrchových struktur tzv. curli (kadeře), tenká proteinová vlákna sdružená do útvarů podobných amyloidům, se účastní tvorby biofilmů a povrchových populací řady bakterií (ZOGAJ et al., 2003). Vedle vazby na neživý povrch společně s celulosou tvoří strukturní složky ECM (BOKRANZ et al., 2005),

účastní se mezibuněčné adheze a rovněž váží komponenty ECM hostitelské tkáně (AUSTIN et al., 1998).

Vedle multimerních vláknitých struktur hrají roli při vývoji mnohobuněčných populací také monomerní specializované proteiny. Lektiny, adhezivní proteiny vážící sacharidové zbytky, se podílí na mezibuněčné interakci a na adhezi bakteriálních buněk k ECM hostitele a účastní se tak tvorby biofilmu (TIELKER et al., 2005). Některé kmeny bakterií, které vykazují vyšší lektinovou aktivitu, tvoří biofilmy efektivněji (AZAKAMI et al., 2006). Vedle již zmíněných proteinů TasA *B. subtillis* a Bap *S. aureus* jmenujme ještě alespoň velkou rodinu tzv. MSCRAMM proteinů gram-pozitivních bakterií, které se účastní interakcí s ECM hostitelské tkáně. Částečně podobným proteinem disponují i buňky gram-negativních bakterií. LapA protein se účastní tvorby biofilmů *P. fluorescens* a *P. putida* a umožňuje kolonizaci různých živých či neživých povrchů jako jsou plast či sklo (ESPINOSA-URGEL et al., 2000; HINSA et al., 2003).

3.2.2.2. Adhezivní proteiny buněčné stěny kvasinek

Adheze kvasinkových buněk je zpravidla zprostředkována specifickými glykoproteiny vnější vrstvy buněčné stěny. Adhezivní molekuly kvasinek se účastní celé řady procesů spojených s buněčnými interakcemi v průběhu konjugace a vývojem mnohobuněčných populací (BRÜCKNER & MÖSCH, 2011). Kvasinkové adheziny jsou charakteristické víceméně podobnou modulární doménovou strukturou (obr. 8) (VERSTREPEN et al., 2004). Obsahují sekreční signál navádějící protein do endoplasmatického retikula, N – koncovou doménu, která je ve většině případů zodpovědná za efektorovou funkci proteinu, centrální silně glykosylovanou doménu složenou z repetitivních elementů bohatých na serin a threonin a C – koncovou část, která obsahuje signál pro připojení glykosylfosfatidylinositolové kotvy. GPI-kotva upevňuje přechodně proteiny do plazmatické membrány. V membráně buněk je lipidická část kotvy odštěpena a protein je navázán cukerným zbytkem na komponenty (zpravidla glukan) buněčné stěny (DRANGINIS et al., 2007).

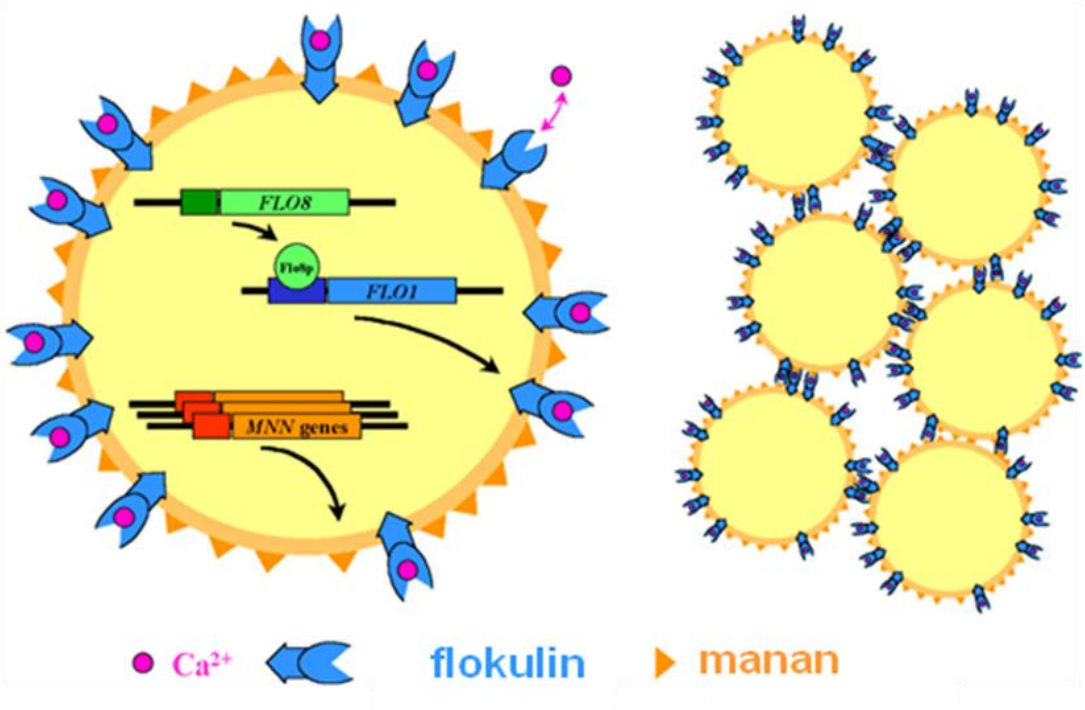


Obr. 8: Charakteristická doménová struktura kvasinkových adhezivních proteinů.

3.2.2.2.1. Adhezivní proteiny *S. cerevisiae*

Buňky *S. cerevisiae* disponují několika funkčně odlišnými adhezivními proteiny. Adheziny specifické pro odlišné párovací typy (a,α) – aglutininy (Aga1p, Aga2p, Sag1p) – se účastní interakce buněk v průběhu konjugace. N – koncová část aglutininu α buněk Sag1p obsahuje imunoglobulinovou doménu a jeho ligandem je vazebná podjednotka aglutininu a buněk Aga2p. Podstatou adheze buněk dvou párovacích typů v průběhu pohlavního rozmnožování je tedy protein-proteinová interakce (DRANGINIS et al., 2007).

Proteiny tzv. FLO rodiny, flokuliny, se účastní vzájemné adheze buněk a adheze buněk k substrátu, nezbytné pro vznik celé řady mnohobuněčných útvarů *S. cerevisiae*. Proteiny Flo1p, Flo5p, Flo9p a částečně také Flo10p se primárně účastní mezibuněčných interakcí (GUO et al., 2000) vegetativních buněk při tvorbě mnohobuněčných shluků v průběhu tzv. flokulace (viz výše). Flokuliny váží za pomoci své N – koncové domény sacharidové zbytky buněčné stěny protější buňky a reprezentují tedy skupinu lektinových proteinů (VERSTREPEN et al., 2003). Taková vazba je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů a je inhibovatelná volnými sacharidy v okolním prostředí (obr. 9) (MASY et al., 1992).



Obr. 9: Zjednodušený model lektinových mezibuněčných interakcí zprostředkovaných flokuliny (upraveno z www.maltingandbrewing.com).

Analýza N – koncové části výše zmíněných flokulinů prokázala, že obsahuje doménu podobnou tzv. PA14 doméně (NAKAGAWA et al., 2011) a specifickou subdoménu nazvanou

Flo5A, které se účastní vazby manosových derivátů za přímé účasti vápníkových iontů (VEELDERS et al., 2010). Pro zajištění vazby proteinu na povrch protější buňky je potřebné sekundární vazebné místo na subdoméně Flo5A, které nezávisle na přítomnosti vápníku váže manosové deriváty na povrchu vlastní buňky a umožňuje vazbu primárního místa v tzv. trans orientaci (VEELDERS et al., 2010). Lg-Flo1p, modifikovaný protein některých průmyslových kmenů, který umožňuje newFlo typ flokulace (viz kap. 3.1.3.) inhibovatelnou i jinými cukry než pouze manosou, neobsahuje doménu Flo5A a jeho vazebné místo je pak přístupné vazbě více sacharidů (BRÜCKNER & MÖSCH, 2011). Přítomnost a struktura této specifické domény tedy zásadně ovlivňuje vazebné vlastnosti flokulinu. Protein Flo10p, který má doménu Flo5a pozměněnou, vykazuje zpravidla nižší schopnost flokulace a může způsobovat, pokud je zvýšena jeho produkce, i adhezi k substrátu (GUO et al., 2000).

Adhezin Flo11p se účastní mezibuněčných interakcí, zároveň však umožňuje adhezi k celé řadě biotických a abiotických substrátů. Je sice zařazován do rodiny flokulinů, jeho N - koncová doména je však odlišná od ostatních flokulinů a není příliš jasné jakým mechanismem je vazba Flo11p uskutečňována. Funkce Flo11p je značně pleiotropní a variabilní i v závislosti na pozadí určitého kmene *S. cerevisiae*. Flo11p je nezbytný pro flokulaci u kmenů *S. cerevisiae var. diastaticus* (BAYLY et al., 2005), u jiných kmenů pro tvorbu biofilmů na rozhraní kapaliny a vzduchu (ISHIGAMI et al., 2004), vznik strukturovaných kolonií (GRANEK & MAGWENE, 2010) a také povlaků na plastovém povrchu (REYNOLDS & FINK, 2001) a filamentární růst (viz dále) (LO & DRANGINIS, 1998). Mezibuněčná interakce u flokulujících buněk *S. diastaticus* se zdá být výsledkem vzájemné adheze proteinů Flo11p adherujících buněk, kdy proteiny vzájemně rozeznávají svou specifickou manosylaci (DOUGLAS et al., 2007). Role při adhezi k povrchu je přičítána nespecifické funkci proteinu při zvyšování hydrofobicity buněčného povrchu (REYNOLDS & FINK, 2001). Zvýšená produkce flokulinů Flo1p, Flo5p, Flo9p totiž rovněž zvyšuje hydrofobicitu povrchu buňky a takové kmeny jsou pak také schopny adherovat k plastu (VAN MULDERS et al., 2009). Neinvadují ovšem agarový substrát a navíc buňky laboratorních kmenů exprimující *FLO11* jsou schopny adheze i ke spíše hydrofilním povrchům (PUREVDORJ-GAGE et al., 2007). To naznačuje, že mechanismus adheze k povrchu zprostředkovaný proteinem Flo11p musí zahrnovat více než jen pouhé zvýšení hydrofobicity povrchu buněk.

Řada studií ukazuje, že rovněž centrální domény flokulinů mohou přispívat k jejich adhezivním vlastnostem. Tyto domény jsou složeny z repetitivních oblastí bohatých na serin a threonin, které jsou silně glykosylovány. Množství repetitivních částí a tedy délka této

domény pozitivně ovlivňuje funkci daného proteinu (FIDALGO et al., 2006; VERSTREPEN & KLIS, 2006; ZARA et al., 2009). Repetitivní oblasti jsou také cílem mnoha rekombinací a mají tak evoluční význam při vzniku nových variant proteinů s různými adhezivními vlastnostmi (VERSTREPEN & FINK, 2009; VERSTREPEN et al., 2004). Silná glykosylace centrální domény by mohla být zodpovědná za vysokou hydrofobicitu proteinů, kdy byl skutečně prokázán vztah mezi zvýšenou hydrofobicitou a manosylací proteinu (MASUOKA & HAZEN, 1997). Centrální doména proteinů Flo1p, či Flo11p obsahuje rovněž sekvenční oblasti, které mají potenciál k tvorbě amyloidů. Díky shlukování těchto domén dochází k tvorbě multimerů proteinů, což by mohlo sloužit k pevné fixaci N - koncové adhezivní domény a zvýšení kapacity vázat ligand v trans orientaci (RAMSOOK et al., 2010).

Funkce flokulinů sice nejsou identické, ale mohou se často do jisté míry překrývat a jejich schopnost zastávat různé funkce závisí na genetickém pozadí jednotlivých kmenů. Společně s vysokým rekombinačním potenciálem proto mají nezastupitelný význam pro vznik řady fenotypů a umožňují rychlou a efektivní reakci populace buněk na měnící se podmínky vnějšího prostředí (DRANGINIS et al., 2007).

3.2.2.2.2. Adhezivní proteiny patogenních kvasinek *Candida* sp.

Buněčná stěna patogenních kvasinek je vybavena širokou škálou adhezivních proteinů. Mezi nejvýznamnější se řadí především proteiny z ALS (aglutinin-like sequence) rodiny *C. albicans*, které se účastní jak mezibuněčných interakcí, tak adheze mezi buňkami a biogenním či nebiogenním substrátem. N-koncová doména Als proteinů má, podobně jako je tomu u aglutininů *S. cerevisiae*, imunoglobulinový charakter a je zodpovědná za adhezivní funkci (KLIS et al., 2009). Proteiny Als jsou schopné vázat širokou škálu syntetických peptidů a zprostředkovávají vazbu na hostitelskou tkáň a umožňují tak její kolonizaci (DRANGINIS et al., 2007). Některé z těchto proteinů (Als1p, Als3p, Als5p) se rovněž účastní vzájemné adheze buněk a tvorby biofilmu (NOBILE et al., 2008). Podobně jako u flokulinů i centrální repetitivní doména bohatá na threonin má vliv na adhezivní vlastnosti proteinů, kdy větší množství repetic způsobuje silnější adhezi Als3p k epiteliálním buňkám (OH et al., 2005) a centrální doména Als5p je potřebná pro vazbu k fibronektinu a agregaci buněk (RAUCEO et al., 2006). Centrální doména Als proteinů je rovněž zodovědná za shlukování proteinů ve formě amyloidů, což zvyšuje adhezi buněk, jejich masivní agregaci a přispívá k tvorbě biofilmů (GARCIA et al., 2011).

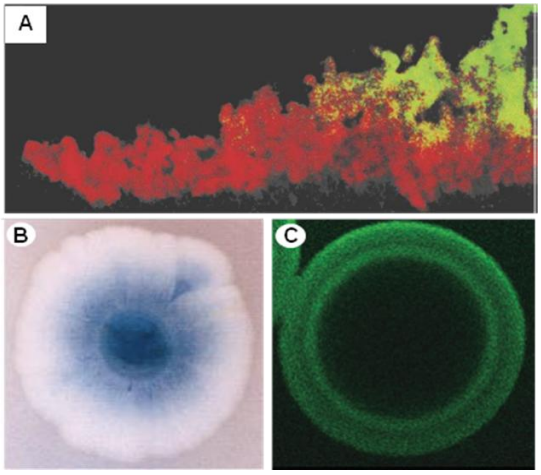
Jiná adhezivní molekula Eap1p umožňuje adhezi buněk *C. albicans* na plastový povrch a umožňuje tak kolonizaci umělých materiálů v těle hostitele (LI & PALECEK, 2003). Eap1p se

rovněž podílí na tvorbě biofilmů v případě *in vitro* i *in vivo* modelů (LI et al., 2007). Adhezivní protein Hwp1p zprostředkovává adhezi k povrchu hostitelské buňky. Je ligandem tranglutaminas na povrchu savčích buněk, což vede k ireverzibilnímu propojení buněk *C. albicans* a hostitelské matrix (STAAB et al., 1999). Bylo prokázáno, že hraje roli i při tvorbě biofilmů (NOBILE et al., 2006), mimojiné také možnou účastí na mezibuněčných interakcích vazbou s proteiny Als1p a Als3p (NOBILE et al., 2008).

EPA rodina adhezivních proteinů další patogenní kvasinky *C. glabrata* je podobná flokulinům *S. cerevisiae*, kdy tyto proteiny obsahují PA14 doménu a váží sacharidy, v tomto případě převážně galaktosové polymery. Zprostředkovávají adhezi buněk ke složkám tkáně hostitele v průběhu kolonizace a jsou rovněž důležité pro tvorbu biofilmů (KAUR et al., 2005).

3.2.3. Diferenciace buněčných populací

Jednou ze základních vlastností mnohobuněčných organismů je schopnost buněk diferencovat a tvořit buněčné populace, které plní specifické funkce a podílejí se tak na zajištění prosperity celého organismu. Ani často klonální mnohobuněčné útvary mikroorganismů nejsou homogenními populacemi buněk vykazujících jednotné fyziologické vlastnosti. Efektním důkazem heterogenity buněčných populací je sledování produkce určitých proteinů v buňkách tvořících mnohobuněčná společenstva. Tyto přístupy poukazují na odlišnou genovou expresi v různých oblastech biofilmů či kolonií, jak bakterií, tak kvasinek a často odhalují specifické expresní profily daných proteinů (obr. 10) (MINÁRIKOVÁ et al., 2001; VÁCHOVÁ et al., 2009) a fascinující stratifikaci útvarů (VLAMAKIS et al., 2008; WERNER et al., 2004).



Obr. 10: Odlišná exprese specifických proteinů v různých částech mnohobuněčných útvarů mikroorganismů. A) Exprese dvou odlišných fluorescenčních proteinů z promotorů specifických genů a jejich lokalizace v rámci biofilmu *B. subtilis* (VLAMAKIS et al., 2008), B) exprese genu lacZ z promotoru specifického genu v kolonii *S. cerevisiae* (MINÁRIKOVÁ et al., 2001), C) produkce fúzního proteinu Ato1p-GFP v kolonii *S. cerevisiae* (VÁCHOVÁ et al., 2009).

Je nadevší pochybnost, že mnohobuněčné útvary jsou složeny z morfologicky a funkčně odlišných buněk, které zásadním způsobem ovlivňují tvorbu, strukturu či ochranu celého společenství často bez ohledu na svůj vlastní osud. Existence a bistabilní povaha řady

buněčných vývojových procesů (buněčná morfogeneze, buněčná smrt, sporulace) a značná časoprostorová heterogenita mnohobuněčných komunit generující odlišná mikroprostředí s gradienty živin a signálních látek rovněž přispívají k fenotypové divergenci mnohobuněčných struktur mikroorganismů.

3.2.3.1. Morfologicky odlišné buňky při vývoji mnohobuněčných útvarů

Různé druhy bakterií jsou schopny tvořit celou řadu morfologicky odlišných buněk. Takové typy buněk pak mohou významnou měrou přispívat ke vzniku, vývoji a heterogenitě mnohobuněčných struktur. Pohyblivé buňky jsou často esenciální pro iniciační fázi tvorby biofilmů (O'TOOLE & KOLTER, 1998) (viz také kap. 3.2.2.1.) a tvoří bazální vrstvu biofilmů a kolonií. Byť tímto jejich role při vývoji mnohobuněčných útvarů pravděpodobně končí, svou pohyblivost později ztrácejí a jsou přeměňovány například na buňky produkující ECM, jsou esenciální a specifickou buněčnou subpopulací tvořící biofilmy (VLAMAKIS et al., 2008). Morfologicky odlišné buňky proliferující v populacích kolonií *Paenibacillus dendritiformis* v závislosti na kultivačních podmínkách dávají vznik až bizarním povrchovým strukturám (BEN-JACOB et al., 1998). V biofilmech *Pseudomonas* sp. nacházíme vedle klasických tyčkovitých buněk také výrazně protáhlé vláknité buňky. Jejich zastoupení se liší v závislosti na vývojové fázi biofilmů (SILLANKORVA et al., 2008) a často vznikají při stresových podmínkách např. hladovění, kdy by mohly sloužit k zisku hůře dosažitelných živin (STEINBERGER et al., 2002).

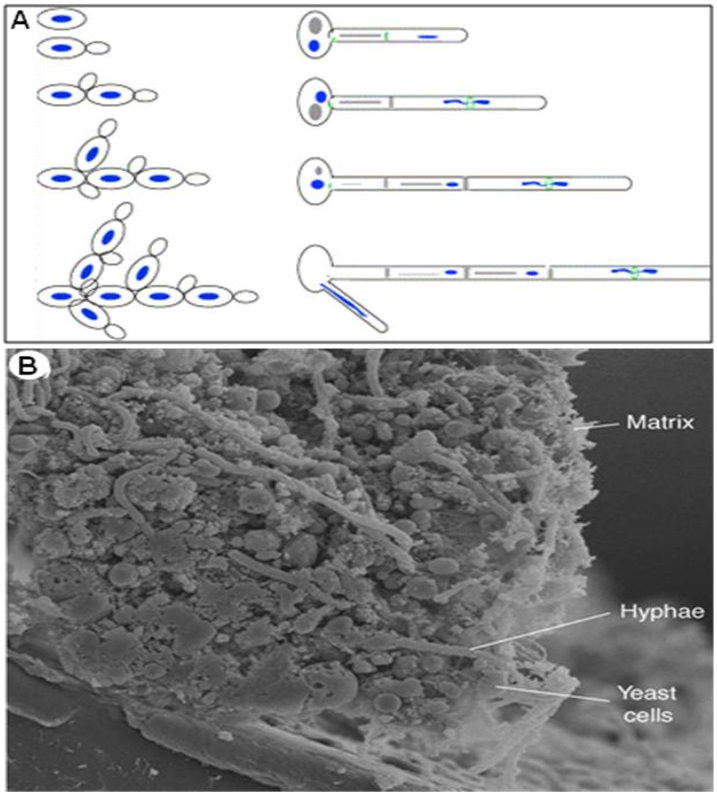
3.2.3.1.1. Dimorfismus u kvasinek

Kvasinky jsou schopny měnit způsob svého buněčného dělení, morfologické vlastnosti buněk a tím charakter svého růstu a tvořit protáhlé buňky spojené ve formě vícebuněčných vláken. Byť se pro takové přechody na polarizovaný typ růstu vžil název dimorfická tranzice (tedy přechod mezi dvěma morfologicky odlišnými typy buněk), může být repertoár vláknitých útvarů u některých druhů kvasinek širší. Takové druhy pak vedle tzv. pseudohyf, tedy vláken vznikajících polárním typem pučení a elongací buněk (generované prodloužením G2 fáze buněčného cyklu), které zůstávají vzájemně spojeny i po skončení pučení (GANCEDO, 2001), tvoří také tzv. hyfy (SUDBERY et al., 2004). Hyfální buňky vznikají tzv. klíčením z původně oválných kvasinkových buněk. Další růst hyfálního vlákna má, na rozdíl od pseudohyf, které vznikají klasickým pučením, charakter dělení buněk, kdy k tvorbě septa dochází uvnitř rostoucího vlákna. Tento způsob tvorby pseudohyf a hyf má za následek jejich typický vzhled, který pomáhá k jejich snadnému rozlišení. Pseudohyfální vlákna jsou zúžena v místech styku mateřské buňky a pupenu, kdy poslední buňka vlákna je vždy nejmenší,

zatímco hyfální vlákna mají stejný průměr po celé délce a poslední buňka bývá zpravidla naopak nejdelší, pokud ještě nedošlo ke vzniku septa (obr. 11) (SUDBERY et al., 2004).

Sama o sobě je schopnost vláknitého růstu vývojovou alternativou, pomocí níž buňky reagují na určité změny ve vnějším prostředí. Například patogenní kvasinka *C. albicans* tvoří pseudohyfy při teplotě 35ºC, hodnotě pH média 6 či přítomnosti vyšší koncentrace fosfátu, zatímco k tvorbě hyf dochází při zvýšené teplotě a pH a v přítomnosti specifických faktorů jako je sérum či N-acetylglukosamin. Obě vláknité formy umožňují invazi různých substrátů a mohou se podílet na kolonizaci tkáně hostitele v počátečních fáze infekce (GOW et al., 2002). Jaký je specifický význam jednotlivých forem není úplně zřejmé. Mohly by být vhodným programem za specifických podmínek, ale také se spekuluje, že je pseudohyfa jakousi přechodovou fází mezi růstem ve formě blastospor (kvasinkových buněk) a hyf (SUDBERY et al., 2004).

V biofilmech *C. albicans* dochází po adhezi a ustavení mikrokolonií k proliferaci pseudohyfálních a hyfálních buněk a, v kombinaci s produkcí ECM, tvorbě heterogenní trojrozměrné struktury (obr. 11) (BAILLIE & DOUGLAS, 1999). Kmeny neschopné tvorby vláknitého růstu tvoří spíše tenké biofilmy bez typické mnohovrstevné struktury. Byť vláknité buňky nejsou samy o sobě nezbytné pro tvorbu biofilmů, bezprecedentně přispívají k jeho strukturní integritě a komplexní architektuře (RAMAGE et al., 2002c).



Obr. 11: Morfogeneze kvasinkových buněk. A) Schéma vzniku a morfologické odlišnosti pseudohyf (vlevo) a hyf (vpravo) (SUDBERY et al., 2004), B) biofilm *C. albicans* s vyznačenými strukturálními složkami (kvasinkové buňky – yeast cells, hyfy – hyphae, ECM – matrix) (NETT & ANDES, 2006).

Strukturované kolonie *C. albicans* jsou rovněž složeny směsí buněk s různou morfologií (JOSHI & GAVIN, 1975), kdy se zdá, že jejich vzájemný poměr a prostorová lokalizace přispívá k typické struktuře daného morfotypu (PESTI et al., 1999; RADFORD et al., 1994). Kupříkladu vrásnění kolonií vznikajících při přepínání fenotypů kmene *C. albicans* 3153A (SLUTSKY et al., 1985) je přičítáno zejména tvorbě hyfálních buněk na povrchu kolonie (RADFORD et al., 1994).

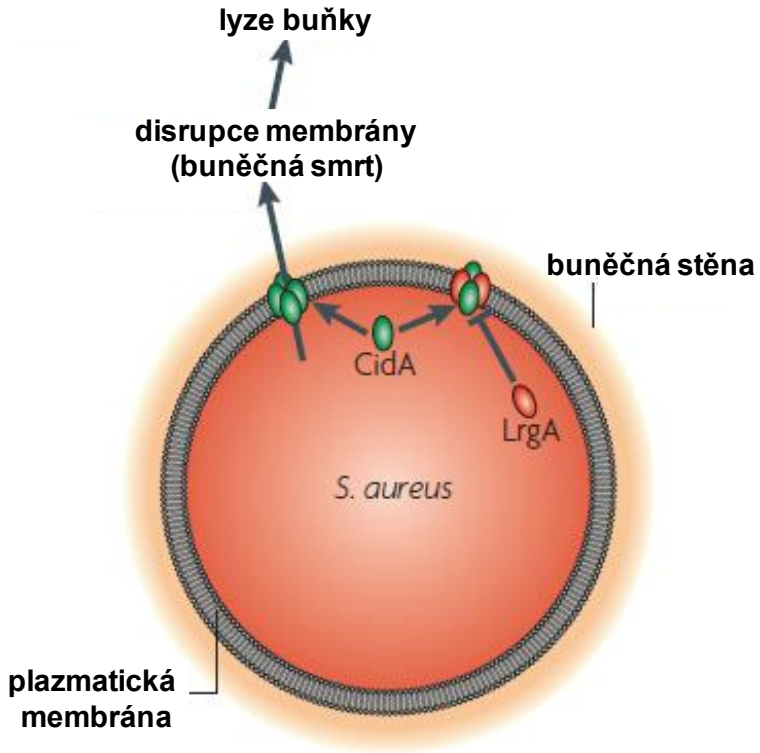
Schopnost tvorby vláknitého růstu u kvasinky *S. cerevisiae* byla primárně definována jako reakce populace buněk na nedostatek dusíku (GIMENO et al., 1992). Byla ovšem rovněž nalezena řada dalších faktorů, které mohou vznik pseudohyf indukovat, jako je nedostatek aminokyselin (BRAUS et al., 2003), přítomnost přiboudlých alkoholů (DICKINSON, 1996) či zdroj uhlíku (ZARAGOZA & GANCEDO, 2000). Tvorba pseudohyf je často spojena s adhezivní schopností a invazí substrátu a slouží tedy pravděpodobně populaci buněk ke kolonizaci okolí a zisku nedostatkových živin. Tvar a charakter růstu buněk rovněž ovlivňuje vzhled a strukturu mnohobuněčných kolonií. Hladovějící kolonie rostoucí na povrchu agaru díky přechodu okrajových buněk na vláknitý růst získávají typický střapatý vzhled (KRON, 1997). Strukturované kolonie některých přírodních kmenů *S. cerevisiae* jsou charakterizovány přítomností pseudohyfálních buněk (CASALONE et al., 2005), zatímco kolonie hladké morfologicky odlišné typy buněk neobsahují (KUTHAN et al., 2003).

3.2.3.2. Programovaná buněčná smrt při vývoji populací

Buněčná smrt samozřejmě není výhodnou strategií pro jednobuněčný organismus, je však velmi důležitým znakem mnohobuněčných organismů, kdy slouží k odstraňování starých či poškozených buněk v populaci a přispívá k vývoji organismu jako celku. Bakterie disponují schopnostmi autolýzy buněk, která by mohla plnit podobnou funkci v bakteriálních populacích jako programovaná buněčná smrt (PCD) u vyšších organismů, kdy například eliminuje buňky *E. coli* nakažené bakteriofágy (ENGELBERG-KULKA et al., 2006). Mechanismy buněčné lyze jsou zpravidla založené na existenci systému toxin-antitoxin v buňce, kdy za normálních okolností jsou obě složky v rovnováze. V přítomnosti nějakého stresového faktoru, například limitace živin nebo specifického signálu, dochází k redukci produkce antitoxinu, která vede k toxinem indukované smrti buněk (obr. 12) (ROSENBERG, 2009). Takové chování by mohlo být výhodné pro početné populace buněk, kde většina lyzovaných buněk může poskytnout živiny pro malou část buněk přeživších, což zajistí perzistenci dané populace (ENGELBERG-KULKA et al., 2006).

Subpopulace buněk procházejících autolytickou variantou buněčné smrti a jejich specifická lokalizace hrají důležitou roli při vývoji bakteriálních mnohobuněčných útvarů

(BAYLES, 2007). Velká část populace plodnice *Myxococcus xanthus* lyzuje a živiny z nich uvolněné jsou použity pro vývoj spor (NARIYA & INOUYE, 2008). PCD určité populace buněk v biofilmech *P. aeruginosa* je pravděpodobně zodpovědná za uvolnění DNA z buněk, která hraje roli při tvorbě prostorové struktury biofilmu (ALLESEN-HOLM et al., 2006). Podobnou funkci by mohla plnit lyze buněk i v biofilmech *S. aureus*, kdy mutanty neschopné buněčné smrti tvoří méně adherentní biofilmy s výrazně změněnou strukturou (RICE et al., 2007). Uvolnění buněk při disperzi biofilmu *P. aeruginosa* je zase umožněno lyzí buněk nacházejících se pod vrstvou ECM způsobující její natrávení uvolněnými enzymy (MA et al., 2009). Mechanismy umožňující PCD mohou být využity i jako prostředek kanibalistického chování části populace. Tímto způsobem populace buněk v biofilmech *B. subtilis* produkující ECM registrující nedostatek živin spouští produkci extracelulárního toxinu zabíjejícího „nepotřebné" buňky v okolí, zatímco samy jsou chráněny díky produkci antitoxinu. Tímto způsobem získávají živiny pro svou vlastní proliferaci a bylo prokázáno, že takto rovněž oddalují proces tvorby spor (LOPEZ et al., 2009a).



Obr. 12: Mechanismus PCD u *S. aureus*. LrgA faktor inhibuje multimerizaci proteinu CidA. Porušení této rovnováhy ve prospěch CidA vede k tvorbě pórů v plazmatické membráně a následné lyzi, a tedy smrti, buněk (BAYLES, 2007).

U kvasinek rovněž pozorujeme znaky charakteristické pro programovanou buněčnou smrt, které dokonce připomínají apoptózu jako formu buněčné smrti zásadním způsobem se lišící

od prosté buněčné lyze (HERKER et al., 2004). V koloniích *S. cerevisiae* dochází k PCD buněk nacházejících se v centrální části kolonie, kde dochází k akumulaci stresových faktorů, zatímco buňky na okraji kolonie modulují svůj metabolismus na základě amoniakového signálu a na stres se účinně adaptují. Tento typ PCD brání nekontrolované lyzi buněk, která by způsobila rozšíření toxických produktů metabolismu do zbytku populace a umožňuje jejich efektivní metabolizaci na netoxické látky, které jsou později využity pro růst okrajových částí kolonie (VÁCHOVÁ & PALKOVÁ, 2005). PCD procesy lze pozorovat i v biofilmech *C. albicans* vystavených působení amfotericinu B. Zřejmě je to však důsledek působení stresoru na populaci a není zřejmé, že by existence PCD hrála významnou úlohu při vývoji biofilmů (AL-DHAHERI & DOUGLAS, 2010).

3.2.3.3. Populace odolných buněk v kontextu mnohobuněčných útvarů

Vznik spor, specifických typů buněk rezistentních vůči široké škále extrémních podmínek, je dalším z vývojových programů buněk mikroorganismů využívaných při zaregistrování určitého typu stresu, zpravidla hladovění na některou z důležitých živin. Proces sporulace je ovšem velmi zajímavým způsobem u řady mikroorganismů provázán s vývojem mnohobuněčných populací, kdy generuje buňky umožňující expanzi populace či její obnovení za příznivých podmínek (VLAMAKIS et al., 2008).

Vznik spor může být v kontextu komplexních útvarů poměrně složitě prostorově a časově regulován a často je důvodem proč takové útvary vůbec vznikají. U již zmíněných sociálních myxobakterií dochází ke sporulaci pouze po vzniku specializovaných plodnicových struktur (SHIMKETS, 1990). Spory bakterie *B. cereus* tvoří za určitých podmínek až 90% populace biofilmu, který se tak formuje k zajištění vysoké lokální koncentrace spor a následné masivní rozšíření populace (WIJMAN et al., 2007). V biofilmech *B. subtilis* vzniká subpopulace sporulujících buněk z populace buněk produkujících ECM zejména na okrajích útvaru (VLAMAKIS et al., 2008) a za určitých podmínek dochází dokonce ke vzniku specifických vyvýšenin obsahujících vysokou koncentraci spor (BRANDA et al., 2001). Ekonomicky nákladný proces tvorby spor může být v bakteriálních biofilmech rovněž specifickými mechanismy oddalován (LOPEZ et al., 2009a).

Sporulace u kvasinky *S. cerevisiae* je iniciována nedostatkem uhlíkatých a dusíkatých živin. V průběhu sporulace kvasinkové buňky přestávají vegetativně růst a procházejí meiotickým dělením. Haploidní spory jsou obaleny masivní buněčnou stěnou a uspořádány v útvaru zvaném vřecko (NEIMAN, 2011). Vedle specifických stopek kvasinek, kde se spory tvoří ve špičce útvaru (SCHERZ et al., 2001), rovněž kolonie mohou obsahovat specificky lokalizované populace sporulujících buněk. Spory jsou i v morfologicky odlišných koloniích

mnoha různých kmenů *S. cerevisiae* uspořádány podobně ve dvou vrstvách, jedné na povrchu média a druhé na okraji kolonie, fyzicky separovaných vrstvou nesporulujících buněk (PICCIRILLO & HONIGBERG, 2010). Autoři spekulují, že podobný konzervovaný vzorec výskytu spor v kolonii by mohl sloužit v přírodních podmínkách v případě smíšených populací různých kmenů k zajištění variability či konzervaci živin pro určitou oblast populace. Existence horní vrstvy spor naznačuje její účast při rozšiřování populace (PICCIRILLO & HONIGBERG, 2010). Tuto teorii podporuje skutečnost, že vznik spor v koloniích některých kmenů je závislý na produkci vyčnívajících vláknitých buněk (WHITE et al., 2011).

V mnohobuněčných útvarech některých nesporulujících mikroorganismů vznikají s relativně vysokou frekvencí metabolicky dormantní buňky, které jsou výrazně odolnější k toxickým látkám než zbytek populace (LEWIS, 2010). K takovému přechodnému a reverzibilnímu stavu určité subpopulace tzv. perzistujících buněk pravděpodobně dochází náhodně a mechanismus zvýšené rezistence je důsledkem utlumení řady procesů a snížení exprese genů, které jsou cílem antibiotických látek. Z hlediska jedné buňky je utlumovat bez zjevné příčiny svou růstovou aktivitu nepříliš výhodnou strategií, v populačním kontextu je vznik rezistentní buněčné subpopulace účinným adaptačním mechanismem zajišťujícím přežití populace v nepříznivých podmínkách (DAWSON et al., 2011). Perzistující buňky tvoří až 1% populace biofilmů *E. coli*, *P. aeruginosa* a *S. aureus* (DAWSON et al., 2011). V biofilmech patogenní kvasinky *C. albicans* je rovněž možné najít buňky vykazující zvýšenou rezistenci vůči antimykotickým látkám a přesto, že není jisté jakým způsobem jsou jejich vlastnosti zajištěny, se zdá, že významnou měrou přispívají ke zvýšené rezistenci biofilmu jako celku (LAFLEUR et al., 2006).

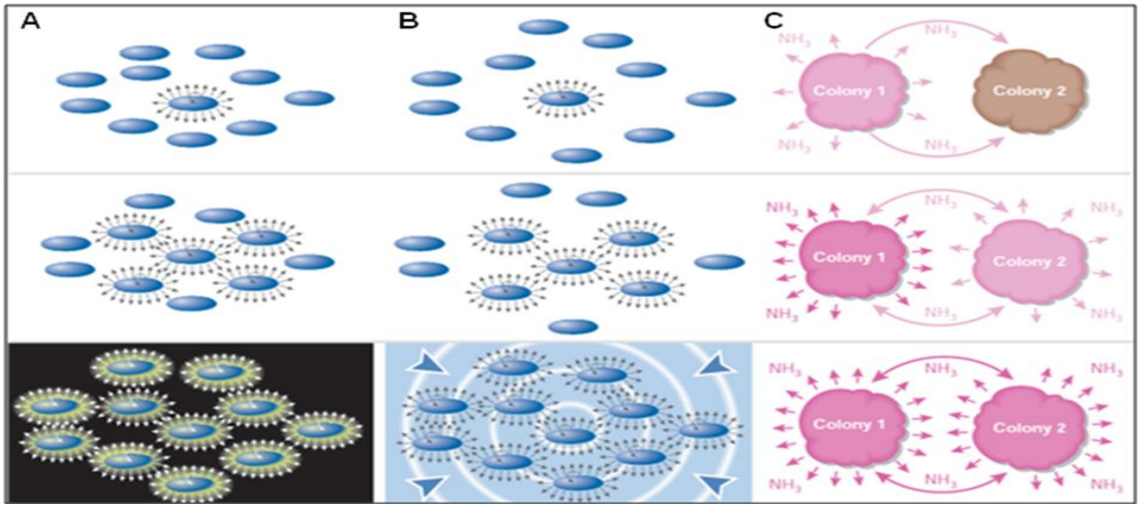
3.2.3.4. Ochranná funkce specifických buněčných populací

Určité buněčné populace mohou díky specifickým vlastnostem rovněž plnit funkci ochranných vrstev bránících průchodu některých látek k buňkám uvnitř mnohobuněčných společenstev. Buňky produkující ECM v průběhu maturace biofilmu *P. aeruginosa* jsou lokalizovány zejména na periferii mikrokolonií a formují tak bariéru obklopující buňky uvnitř mikrokolonie (MA et al., 2009). Vnější vrstvu stopkatých útvarů *S. cerevisiae* zase tvoří několik vrstev většinou mrtvých buněk, které však stále mají kompaktní a nezvykle masivní buněčnou stěnou a zřetelně ohraničují populace buněk uvnitř stopky (SCHERZ et al., 2001). Kolonie laboratorních kmenů *S. cerevisiae* jsou pokryté ochrannou vrstvou buněk bránící průchodu některých látek pravděpodobně díky odlišnému proteinovému složení buněčné stěny (VÁCHOVÁ et al., 2009). Mnohobuněčné floky tvořené směsnou populací buněk

produkujících a neprodukujících povrchový adhezin Flo1p jsou tvořeny výhradně buňkami, které protein neprodukují a tato populace tak slouží jako první linie buněk vystavených okolnímu stresu (SMUKALLA et al., 2008).

3.2.4. Komunikační mechanismy mikroorganismů

Vznik a vývoj mnohobuněčných útvarů je poměrně komplikovaný proces zahrnující řadu mechanismů, které jsou závislé na koordinovaném chování jednotlivých buněk a buněčných populací. Mikroorganismy jsou schopné vylučovat do svého okolí řadu molekul, pomocí nichž spolu buňky komunikují, ovlivňují své okolí a koordinují tak společně svůj vývoj. Komunikační potenciál signálních molekul často spočívá v autoindukčním efektu, kdy takové látky změnami v genové expresi spouští specifickou odpověď buněk a zároveň produkci signálů samotných. Jako příklady autoindukčních mechanismů mohou sloužit cAMP jako atraktivní signál sloužící k aktivní agregaci buněk *D. discoideum* při tvorbě mnohobuněčných plodnic (SCHAAP et al., 1984), quorum sensing mechanismus (FUQUA et al., 1994) zodpovědný za celou řadu vývojových procesů včetně tvorby biofilmů (NADELL et al., 2008) či amoniaková signalizace kvasinkových kolonií umožňující dlouhodobé přežívání populací, jejich synchronizovaný vývoj a adaptaci na limitaci živin (obr. 13) (PALKOVÁ & VÁCHOVÁ, 2003).



Obr. 13: Příklady autoindukčních komunikačních mechanismů mikroorganismů. A) Quorum sensing vedoucí ke společné odpovědi populace bakterií ve formě bioluminiscence, B) produkce cAMP vedoucí k agregaci buněk *D. discoideum*, C) komunikace a vzájemná indukce kvasinkových kolonií s využitím amoniaku jako signální molekuly (PALKOVÁ, 2004)

3.2.4.1. Quorum sensing

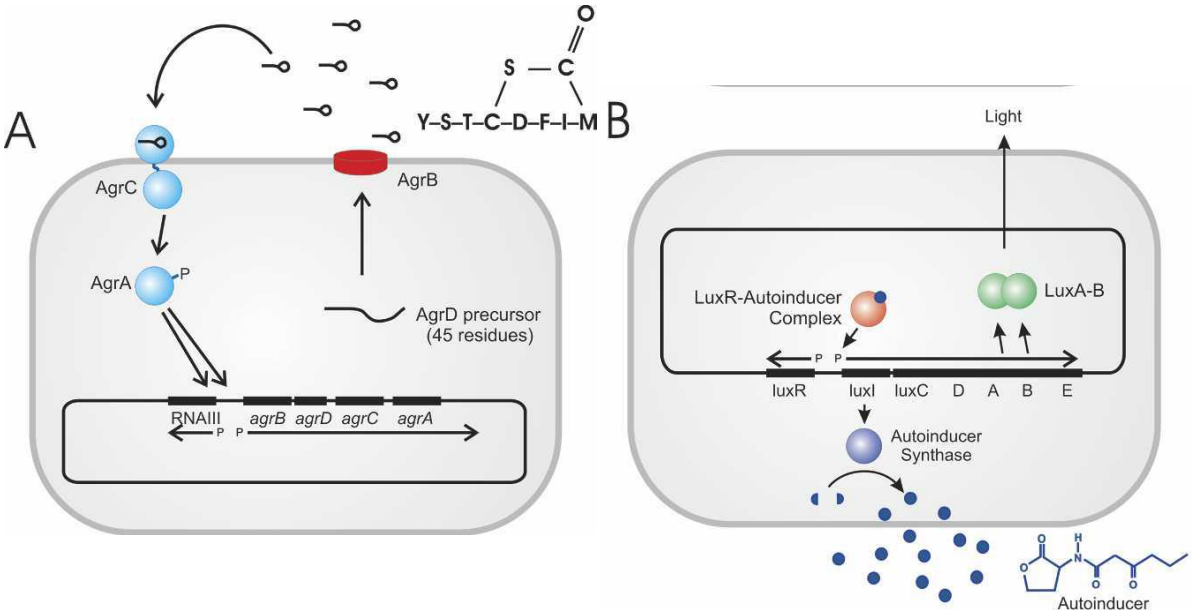
Quorum sensing je mechanismus komunikace mikrobiálních buněk charakterizován primárně jako fenomén sloužící k rozpoznávání hustoty populace. Při růstu buněk a zvyšování

buněčné denzity dochází k akumulaci signálních molekul produkovaných buňkami a po dosažení určité kritické koncentrace (a tedy určité hustoty buněk) dochází k signálem spuštěné reakci populace skrze regulaci genové exprese, včetně syntézy a produkce vlastního induktoru (FUQUA et al., 1994). Quorum sensing tedy umožňuje realizaci chování, které může sloužit k adaptaci na určité podmínky prostředí, například omezení růstové rychlosti před dosažením kritické hustoty populace a fatálního vyčerpání živin, nebo chování, které má smysl pouze při simultánním projevu velkého počtu buněk. Vedle toho však takový mechanismus může sloužit k rozpoznávání difúzní bariéry v okolí a regulovat např. společné vylučování hydrolytických enzymů (REDFIELD, 2002). Quorum sensing ovlivňuje širokou škálu různých procesů. Vedle adaptace buněk na specifické podmínky prostředí rovněž mimojiné buněčnou morfogenezi, horizontální přenos DNA, produkci ECM, sporulaci či produkci různých sekundárních metabolitů a virulentních faktorů. Toto variabilní využití a fakt, že mikroorganismy využívají zároveň několik signálních systémů, vede k závěru, že quorum sensing slouží zejména ke koordinaci chování buněčných populací. V případě pouhého rozeznávání hustoty populace by přítomnost mnoha systémů byla nadbytečná. Pokud však takový mechanismus slouží k propagaci koordinovaného chování, pak každý systém reguluje specifický typ odpovědi v závislosti na potřebách populace (PAPPAS et al., 2004).

3.2.4.1.1. Quorum sensing u bakterií při vývoji mnohobuněčných populací

Gram-negativní bakterie využívají jako signální molekuly pro své komunikační mechanismy acylované homoserin laktony (AHL). Tyto látky jsou syntetizovány uvnitř buněk a posléze rychle difundují po koncentračním gradientu skrze plazmatickou membránu do extracelulárního prostoru. Po dosažení určité hustoty populace a tím určité koncentrace signálu se dostávají zpět do buněk a vazbou na regulační proteiny aktivují transkripci určitých genů. Roli signálních molekul u gram-pozitivních bakterií zastávají převážně krátké peptidové fragmenty, které jsou po translaci upravovány a aktivně transportovány ven z buněk. Signál je poté rozeznáván dvousložkovými systémy, kdy membránová receptorová kinasa fosforyluje cytoplazmatický transkripční regulátor, který spouští genovou expresi (obr. 14) (MILLER & BASSLER, 2001). Toto zobecnění a rozdělení však není zcela přesné a striktní. Gram-negativní bakterie využívají i jiné systémy, např. myxobakterie využívají k signalizaci v průběhu svého životního cyklu několika různých molekul, zpravidla směsi aminokyselin, či krátkých peptidů. Jiné bakterie využívají i řady chemicky odlišných molekul, kdy některé skupiny bakterií využívají látky lipidické povahy, jako jsou lipopetid surfaktin či různé mastné kyseliny (PAPPAS et al., 2004). Jakýmsi univerzálním signálem, jenž je využíván napříč

bakteriálním světem, je tzv. AI-2 (Autoinducer 2, chemicky ester furanonu a kyseliny boronové) (CHEN et al., 2002). Právě pro svou univerzálnost a potenciál v mezidruhové komunikaci bývá často nazýván bakteriálním esperantem (PAPPAS et al., 2004; SPRAGUE & WINANS, 2006).



Obr. 14: Quorum sensing mechanismy bakteriálních populací. A) produkce signálních peptidů a jejich rozeznávání dvousložkovým přenosovým systémem u *S. aureus*, B) produkce AHL luminiscentní bakterií *V. fisherii* (SPRAGUE & WINANS, 2006).

Buňky v mnohobuněčných společenstvech dosahují lokálně vysoké buněčné hustoty, důsledkem čehož dochází k akumulaci řady extracelulárních produktů, metabolitů a samozřejmě také signálních molekul. Je patrné, že je to tedy ideální prostředí pro interakci a komunikaci buněk pomocí quorum sensing mechanismů. Jedna z prvních studií zabývajících se vývojem mnohobuněčných populací a rolí mezibuněčné signalizace ukazuje, že prostorová diferenciace a tvorba architektury biofilmu *P. aeruginosa* je závislá na přítomnosti signálních molekul. Mutanty, neschopné produkce jednoho z derivátů homoserin laktonu (3-OC12-HSL), tvoří, ve srovnání s klasickou trojrozměrnou pórovitou strukturou normálních biofilmů, pouze nestrukturované homogenní úzké povlaky (DAVIES et al., 1998). Quorum sensing systémy také u některých kmenů *P. aeruginosa* regulují uvolňování DNA do mezibuněčného prostoru, kde ovlivňuje strukturu a maturaci biofilmu (ALLESEN-HOLM et al., 2006). Jiné kmeny zase potřebují komunikační mechanismy k precizní tvorbě biofilmu pravděpodobně regulací produkce složky ECM – polysacharidu Pel (SAKURAGI & KOLTER, 2007). Acylované homoserin laktony jako signální molekuly gram-negativní bakterie *Serratia liquefaciens* ovlivňují tzv. swarming motility (EBERL et al., 1996), ale také agregaci buněk a jejich morfogenezi potřebnou pro maturaci biofilmů (LABBATE et al., 2004).

Quorum sensing může být rovněž využíván pro negativní regulaci pochodů spojených s vývojem mnohobuněčných populací, kdy slouží k redukci tvorby VPS, hlavní složky ECM, u *V. cholerae*. Absence komunikačních mechanismů naopak vede ke zvýšené produkci ECM a vzniku strukturovaného biofilmu či „vrásčitých" kolonií (HAMMER & BASSLER, 2003). Peptidové signální molekuly *Staphylococcus* sp. mají také spíše negativní vliv na maturaci biofilmu, kdy komunikace neschopné mutantní kmeny tvoří robustnější útvary. Tyto QS molekuly ovšem spouští expresi extracelulárních protéaz, které jsou potřebné pro disperzi části buněk z biofilmu. Z tohoto hlediska tedy nejsou obecným negativním regulátorem vývoje biofilmu, kdy pozitivně ovlivňují určitou část jeho vývoje (BOLES & HORSWILL, 2008). Lipopetid surfaktin nepřímo aktivuje produkci ECM v biofilmech *B. subtilis*. Je zajímavé, že produkci spouští pouze u buněk, které surfaktin samy neprodukují a přispívá tedy tak nejen k prostorové restrukturalizaci biofilmu, ale rovněž k jeho populační diferenciaci. Současně tak rozšiřuje starší schéma role a funkce quorum sensing molekul (LOPEZ et al., 2009b).

3.2.4.1.2. Quorum sensing u kvasinek

Ve srovnání se světem bakterií je prozatím u kvasinek seznam signálních mechanismů a molekul splňujících kritéria vyslovená pro quorum sensing poměrně krátký. Prvním identifikovaným kvasinkovým chemickým signálem, k jehož působení dochází poměrně k hustotě populace, je farnesol. Tato látka brání v přechodu na vláknitý růst buněk *C. albicans* (HORNBY et al., 2001) a to, nikoliv překvapivě, represí exprese genů specifických pro hyfální buňky (CAO et al., 2005). Regulace filamentárního růstu *C. albicans* quorum sensing mechanismem je však velmi komplexní regulační proces. Druhá signální molekula, tyrosol, je totiž schopna hyfální růst naopak indukovat (CHEN et al., 2004). Obě tyto látky se svou regulační schopností podílí na tvorbě biofilmu *C. albicans*. Farnesol inhibicí tvorby hyf a adhezivity buněk plní negativní úlohu při vzniku biofilmu (RAMAGE et al., 2002b). Tyrosol je silně produkován v biofilmech ve srovnání s planktonními buňkami a má stimulační efekt na rané fáze vývoje biofilmu. Je rovněž schopen negovat inhibiční efekt farnesolu na vývoj biofilmu v závislosti na jeho koncentraci (ALEM et al., 2006).

Vláknitý růst *S. cerevisiae* (v tomto případě tvorba pseudohyf) může být rovněž regulován signalizačními molekulami produkovanými v závislosti na hustotě populace. Při hladovění na dusík produkují buňky *S. cerevisiae* aromatické alkoholy tryptophol a fenylethanol, které posléze regulují syntézu genů zodpovědných za pseudohyfální růst, zejména pak genu pro povrchový adhezin *FLO11*. Produkce molekul je, alespoň v případě tryptopholu

autostimulační, kdy jeho přidání k buňkám vede ke zvýšení exprese genů zodpovědných za jeho syntézu (CHEN & FINK, 2006). Taková stimulace pseudohyfálního růstu může sloužit ke kolonizaci okolního prostoru a zisku živin, či tvorbě složitějších mnohobuněčných útvarů (HOGAN, 2006).

3.2.4.2. Amoniak jako *lingua franca* kvasinek

Kvasinky mohou využívat molekulární signály pro adaptaci na nepříznivé podmínky prostředí. Jako takový alarm signál produkovaný kvasinkovou kolonií registrující nedostatek živin byl identifikován plynný amoniak. To vyvolává v části populace změnu v metabolismu a umožňuje efektivní přípravu na budoucí nepříznivé podmínky. Amoniak rovněž slouží jako komunikační kanál mezi jednotlivými kvasinkovými populacemi (Palková et al. 1997). Pokud jsou v okolí kolonie produkující amoniak jiné kolonie, takový signál registrují, provedou příslušné změny nezávisle na své vývojové fázi (již zmíněné reprogramování metabolismu či omezení růstu ve směru signálu) a vyšlou vlastní amoniakový signál zpět. Tímto způsobem si tedy kvasinkové kolonie vyměňují informace o své přítomnosti a účinně regulují a synchronizují svůj vývoj. Amoniak rovněž způsobuje diferenciaci jednotlivých buněčných populací v rámci kolonie a může též ovlivňovat buněčnou morfogenezi a morfologii kolonie (PALKOVÁ & FORSTOVÁ, 2000). Amoniaková signalizace je poměrně univerzálním fenoménem kvasinkového světa, kdy je podobným způsobem využívána různými druhy kvasinek a může tedy též sloužit jako prostředek mezidruhové komunikace (PALKOVÁ & VÁCHOVÁ, 2003).

Amoniak či jeho protonovaná varianta NH_4^+ se rovněž na regulační úrovni účastní mnoha fází životního cyklu sociální hlenky *D. discoideum* a podílí se na diferenciaci populací buněk v rámci mnohobuněčných útvarů (Gross et al. 1983).

3.3. Genetické determinanty vývoje mnohobuněčných populací kvasinek

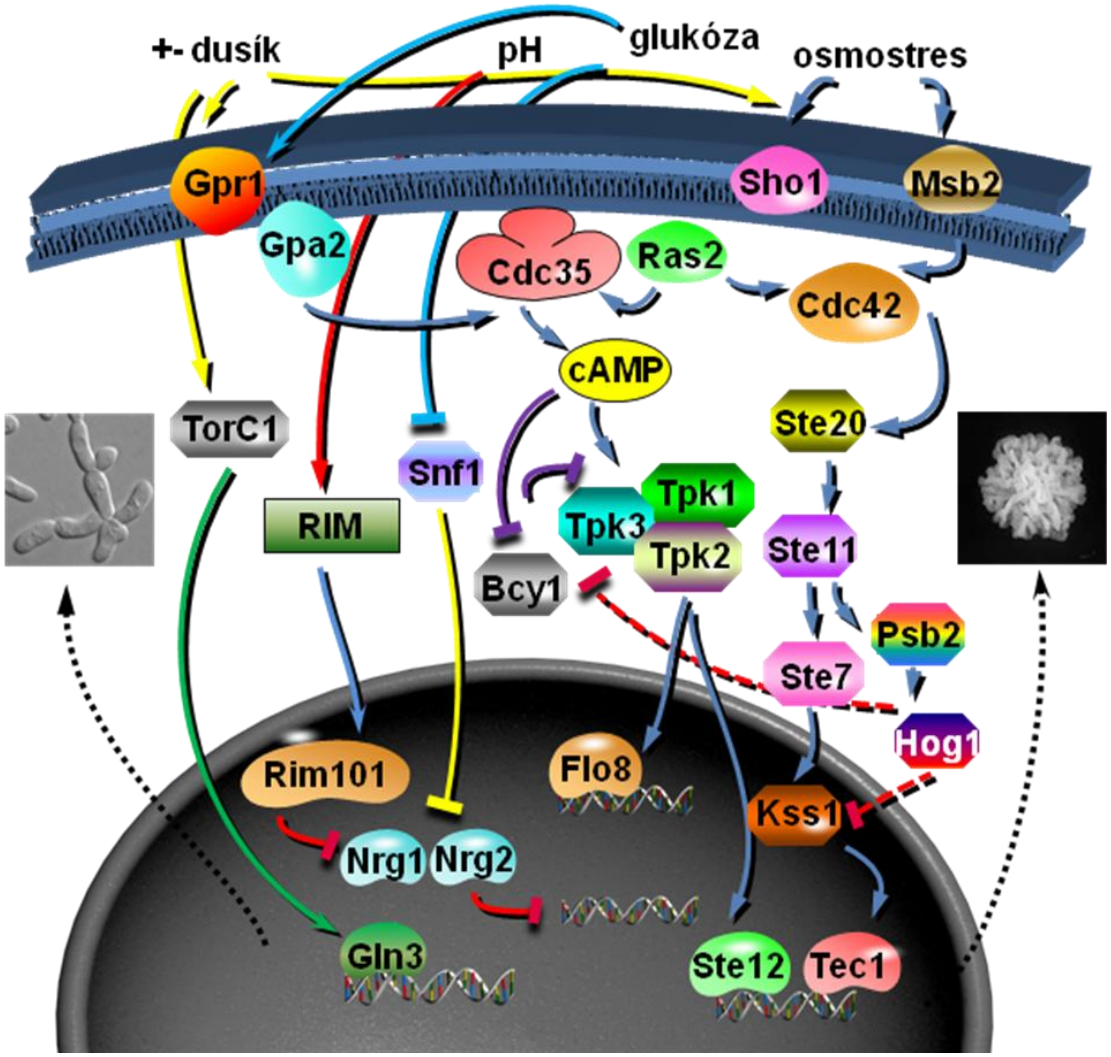
Vznik a vývoj složitých mnohobuněčných útvarů je velmi komplexní proces, ke kterému zpravidla dochází v reakci na podmínky vnějšího prostředí. Kvasinky, stejně jako další organismy, disponují mechanismy, kterými změny v okolním prostředí zaznamenávají a regulací genové exprese spouští adekvátní odpověď. Takový systém zahrnuje receptor, zpravidla na buněčném povrchu, rozpoznávající určitou událost (např. změnu v koncentraci živin), komplexní kinasové kaskády tzv. signálních drah, které informaci přenášejí do buňky a aktivaci či deaktivaci transkripčních faktorů regulujících expresi příslušných genů. Vlastnosti populací mnohobuněčných útvarů a planktonních buněk se výrazným způsobem liší důsledkem dramatických změn v transkriptomových profilech (GARCIA-SANCHEZ et al.,

2004). Právě díky činnosti signálních drah k takovým změnám v genové expresi dochází a proto je, nikoliv překvapivě, řada komponent těchto tzv. vývojových drah potřebná pro vývoj mnohobuněčných útvarů, či alespoň pro vznik vývojových procesů (např. vláknitý růst, či adheze), které se na tvorbě mnohobuněčných útvarů podílejí (GRANEK et al., 2011).

3.3.1. Vývojové dráhy u *S. cerevisiae*

Bylo prokázáno, že hned několik signálních kaskád *S. cerevisiae*, primárně určených k regulaci široké škály buněčných procesů, se určitým způsobem účastní vzniku mnohobuněčných komunit (obr. 15). Takový pleiotropní efekt je typickým rysem takřka všech signálních drah (GRANEK et al., 2011). Nejdůležitějšími signálními kaskádami v kontextu vývoje mnohobuněčných populací se zdají být cAMP/PKA dráha a MAPK kaskáda nazývaná též filamentární dráha (FG dráha). MAPK kaskáda je známa zejména svou účastí při konjugaci buněk, kdy přenáší signál o přijetí feromonu a aktivací kinasy Fus3 reguluje aktivaci procesů nutných pro zahájení konjugace (HUNT et al., 2004). Vedle toho ovšem s využitím této kaskády buňka reaguje na vyčerpání živin (např. dusíku) aktivací Kss1 kinasy a jejích příslušných transkripčních faktorů (GANCEDO, 2001). Řada komponent MAPK kaskády je potřeba pro vývoj komplexních strukturovaných kolonií a pseudohyfálního růstu, kdy jedním z cílů této dráhy je aktivace exprese genu *FLO11*, který je pro tvorbu zmíněných fenotypů nezbytný (GRANEK & MAGWENE, 2010; LO & DRANGINIS, 1998). Generováním cAMP a aktivací proteinkinasy A reaguje buňka primárně na přítomnost glukosy v okolí a reguluje tak svůj růst, metabolismus, případně stresovou odpověď (WERNER et al., 2004). cAMP/PKA dráha se rovněž podílí na regulaci pseudohyfálního růstu (GANCEDO, 2001) a nezávisle na něm na tvorbě komplexních kolonií (GRANEK & MAGWENE, 2010) a opět je jedním z jejích cílů skrze transkripční faktor Flo8p gen *FLO11*. Vedle těchto drah se na tvorbě mnohobuněčných populací může rovněž podílet tzv. dráha glukosové represe reagující prostřednictvím kinasy Snf1p, která reguluje expresi genů produkujících proteiny nutné např. pro utilizaci alternativních zdrojů uhlíku, na nedostatek glukosy (GRANEK et al., 2011). Tato dráha rovněž aktivuje adhezivní vlastnosti buněk a pseudohyfální růst mimojiné regulací exprese genu *FLO11* (KUCHIN et al., 2002). Bylo prokázáno, že i TOR dráha modulující odpověď na přítomnost živin (například aminokyselin) v okolí či Rim101 dráha, pomáhající buňce reagovat na změny pH, by se rovněž mohly určitým způsobem podílet na procesech vedoucích ke vzniku mnohobuněčných populací (BRÜCKNER & MÖSCH, 2011; GRANEK et al., 2011). Roli negativního regulátoru v kontextu morfogenetických dějů by mohla plnit

osmoregulační tzv. HOG dráha, kdy absence kinasy Hog1p vede k vláknitému růstu a vzniku strukturovaných kolonií (FURUKAWA et al., 2009).



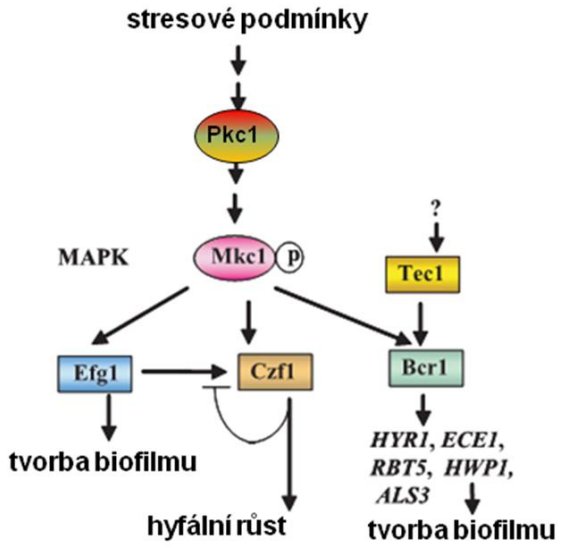
Obr. 15: Schématické znázornění signálních drah *S. cerevisiae* a jejich komponent podílejících se na vzniku strukturovaných kolonií a přechodů na vláknitý růst (upraveno podle www.qiagen.com/geneglobe).

Téměř každá z klíčových signálních drah v buňce se tedy určitým způsobem podílí na vzniku mnoha vývojových procesů, které pozorujeme při mnohobuněčném chování. Jejich efekt je velmi pleiotropní a vyvstává tak otázka, jakým způsobem buňky modulují odpovědi k podmínkám vnějšího prostředí vedoucí ke vzniku často velmi komplexního fenotypu. Odpověď pravděpodobně spočívá v kombinatorním příspěvku jednotlivých drah. Jednotlivé dráhy často sdílí společné komponenty (CHAVEL et al., 2010) a jejich vzájemné ovlivňování a relativní aktivita jsou klíčovými faktory pro vznik a integraci příslušných procesů (GRANEK et al., 2011). Je ovšem zřejmé, že vznik trojrozměrných mnohobuněčných populací je obrovsky

komplexní proces, jehož precizní pochopení a rekonstrukce na molekulární úrovni nebude snadné.

3.3.2. Signální dráhy podílející se na vzniku biofilmů *C. albicans*

Signální kaskády *C. albicans* sdílejí podobné rysy s dráhami *S. cerevisiae* a řada jejich komponent byla identifikována na základě homologie či komplementace funkce v buňkách *S. cerevisiae*. I u *C. albicans* se mnoho signálních drah často redundantním způsobem podílí na procesech jako je adheze, hyfální růst či tvorba biofilmu (BISWAS et al., 2007). Výzkum takových kaskád je tedy důležitý i z medicínského hlediska, kdy inhibitory některých drah zamezují vzniku výše zmíněných procesů přispívajících k virulenci a perzistenci patogenního organismu (GRANEK et al., 2011). Na regulaci vláknitého růstu se za různých podmínek podílejí, podobně jako u *S. cerevisiae*, MAPK kinasová dráha podobná FG dráze *S. cerevisiae*, cAMP/PKA dráha, Rim101 a negativně rovněž HOG dráha, zodpovědná u *C. albicans* převážně za reakci na oxidativní stres (BISWAS et al., 2007). cAMP/PKA dráha reguluje aktivitu důležitého transkripčního faktoru Efg1p, který je nezbytný nejen pro produkci hyf, ale rovněž pro vznik biofilmu (RAMAGE et al., 2002c) a zároveň se podílí na „white-opaque" přepínání fenotypů (SRIKANTHA et al., 2000; VLAMAKIS et al., 2008). Efg1p aktivuje expresi celé řady genů specifických i nespecifických pro hyfální buňky, jež kódují adhezivní proteiny či extracelulární enzymy napomáhající kolonizaci tkání (BISWAS et al., 2007). Na vzniku biofilmů se rovněž podílí tzv. dráha buněčné integrity. Její komponenty, kinasy Pkc1p a Mkc1p, aktivují řadu transkripčních faktorů, např. Bcr1p a možná paralelně rovněž Efg1p, nezbytných pro expresi povrchových adhesinů a vznik normálního biofilmu (obr. 16) (NOBILE & MITCHELL, 2006). PKC dráha nebo alespoň některé její komponenty by se též mohly modulací aktivity glukanas podílet na stavbě a vlastnostech ECM a přispívat tak např. ke zvýšené rezistenci biofilmů (NETT et al., 2011).



Obr. 16: Signální dráha proteinkinasy C a její komponenty regulující expresi genů zodpovědných za vznik biofilmu *C. albicans* (upraveno podle (BISWAS et al., 2007).

3.4. Ztráta sociálních vlastností mikroorganismů

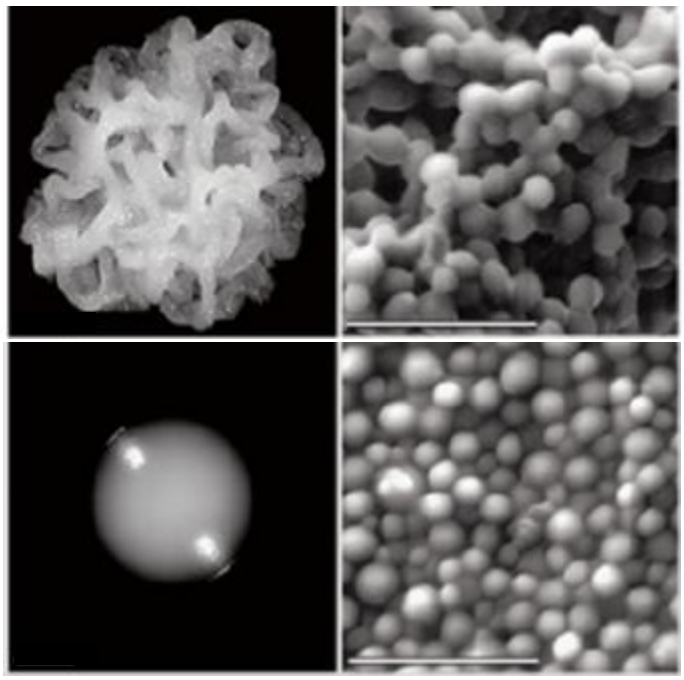
Mikroorganismy pěstované po delší dobu v laboratorních podmínkách ztrácejí řadu vlastností, které jsou typické pro mnohobuněčné populace vyskytující se ve svých přirozených ekosystémech. Kultivace čistých tekutých kultur za stabilních podmínek neposkytuje tlak k tvorbě často nákladných mechanismů zodpovědných za adaptaci na měnící se a nehostinné prostředí v přírodě či v případě patogenních mikroorganismů uvnitř těla hostitele. Naopak jsou tímto způsobem selektovány kmeny vykazující optimální a stabilní fyziologické vlastnosti umožňující jejich snadnou kultivaci. Takové kmeny pak buď nejsou schopny mnohobuněčná společenstva tvořit vůbec, nebo dávají vznik výrazně méně prostorově a funkčně heterogenním útvarům (AGUILAR et al., 2007; PALKOVÁ, 2004).

Typický příklad takového jevu, často nazývaného domestikace, nacházíme u jinak silně sociální skupiny mikroorganismů - myxobakterií. Dlouhodobá kultivace buněk *Myxococcus xanthus* v bohatém médiu v prostředí chemostatu vede ke ztrátě tzv. S pohyblivosti buněk, vlastnosti nezbytné pro jejich agregaci v reakci na podmínky vnějšího prostředí, u všech paralelních buněčných linií. Většina takových populací ztrácí schopnost tvorby plodnic a rezistentních spor, tedy vlastnost zcela charakteristickou pro tuto skupinu bakterií (VELICER et al., 1998).

Přírodní izoláty *B. subtilis* tvoří robustní biofilmy, strukturované kolonie a také plodnice obsahující spory. Oproti tomu běžně používané laboratorní kmeny pravděpodobně po léta strávená ve stabilních podmínkách nashromáždily řadu genetických změn vedoucích ke ztrátě schopnosti tvořit strukturovaná společenstva. Jejich biofilmy jsou tenké a křehké, kolonie hladké a buňky nejsou schopny diferenciace a tvorby plodnic (BRANDA et al., 2001). Domestikované kmeny rovněž neprodukují surfaktin, který mimo jiné slouží jako významná signální molekula při vývoji strukturovaných biofilmů přírodních kmenů (AGUILAR et al., 2007). Klinické izoláty patogenních bakterií *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* či *Vibrio cholerae* tvoří komplexní strukturované kolonie a biofilmy ve srovnání s běžně používanými kmeny (FRIEDMAN & KOLTER, 2004; VALLE et al., 2003; WAI et al., 1998). Tyto rozdíly jsou dány zejména ztrátou či změnou v produkci ECM (FRIEDMAN & KOLTER, 2004). Klinické varianty jsou díky těmto vlastnostem zároveň virulentnější a rezistentnější vůči antibiotikům (WAI et al., 1998).

Podobně jako u bakterií i laboratorní kmeny kvasinek byly selektovány pro vlastnosti, které umožňují snadné a reprodukovatelné studium základních dějů v eukaryotické buňce. Vlastnosti jako jsou fenotypová variabilita, schopnost produkce ECM, vlákintého růstu,

tvorby biofilmů a strukturovaných kolonií proto pozorujeme převážně u klinických izolátů patogenních kvasinek (ASHBEE & BIGNELL, 2009; JAIN et al., 2008) a u přírodních kmenů specificky adaptovaných na určité prostředí (PALKOVÁ, 2004). Při kultivaci přírodního kmene *S. cerevisiae*, který tvoří strukturované kolonie charakteristické komplexní trojrozměrnou strukturou a masivní produkcí ECM, v laboratorních podmínkách dochází s poměrně vysokou frekvencí ke vzniku variant tvořících kolonie hladké (obr. 17) (KUTHAN et al., 2003). Kolonie domestikovaného kmene jsou pak podobné běžně používaným laboratorním kmenů, jejichž vnitřní struktura nevykazuje prostorovou diferenciaci (obr. 17), buňky jsou pravidelně uspořádány bez přítomnosti výraznějších mezibuněčných prostor (VÁCHOVÁ et al., 2009). Změna v morfologii kolonie je provázena dramatickými změnami v expresních profilech obou fenotypů a rovněž mimo jiné ztrátou produkce extracelulární matrix či schopnosti vláknitého růstu (KUTHAN et al., 2003). Tedy vlastností charakteristických pro mnohobuněčná společenstva a faktorů, jejichž studium je nezbytné pro pochopení životního stylu mikroorganismů žijících ve svém přirozeném prostředí.



Obr. 17: Domestikace přírodního kmene *S. cerevisiae* BR-F. Nahoře, strukturovaná kolonie původního kmene, vpravo elektronmikroskopický snímek vnitřní struktury kolonie; dole, hladká kolonie domestikovaného kmene, patrná změna v morfologii, velikosti i vnitřním uspořádání (KUTHAN et al., 2003).

4. Materiál a Metody

4.1. Použitý biologický materiál

Přírodní kvasinkové kmeny *Saccharomyces cerevisiae* BR-F, BR-88, BR-99 a BR-103 byly získány ze sbírky Chemického ústavu Akademie věd Slovenské republiky. Kmen ∑1278 byl získán z laboratoře membránového transportu Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky a kmen $\sum S^h$ vznikl jeho sporulací (podrobnější popis kmenů viz Tabulka 1). Další kmeny (fenotypové varianty, deleční mutanty atd.) byly izolovány či připraveny z uvedených rodičovských kmenů v rámci příslušné studie.

Pro transformaci a amplifikaci plazmidů byl využit bakteriální kmen *E. coli* DH5α (F^-, φ80d*lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA*1, *endA*1, *hsdR*17(rk^-, mk^+), *phoA*, *supE*44, λ^-, *thi*-1, *gyrA*96, *relA*1)

Kmen	Genotyp	Původ (reference)	Použití
S. cerevisiae ΣS^h	MATa	Sporulace kmene Σ1278 (VOPÁLENSKÁ et al., 2005)	(kap. 5.1.)
S. cerevisiae $\Sigma 1278^d$	MATa/MATα	Původně komerční sbírka pekařských kvasinek (MORTIMER & JOHNSTON, 1986)	(kap. 5.1.)
S. cerevisiae BR-88	MATa/MATα	plodnice hub, Záhorská nížina, jihozápadní Slovensko (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ et al., 1988)	(kap. 5.2.)
S. cerevisiae BR-99	MATa/MATα	řeka Dunaj, jihozápadní Slovensko (SLÁVIKOVÁ & VADKERTIOVÁ, 1997a)	(kap. 5.2.)
S.cerevisiae BR-103	MATa/MATα	řeka Morava, jihozápadní Slovensko (SLÁVIKOVÁ & VADKERTIOVÁ, 1997b)	(kap. 5.2.)
S. cerevisiae BR-F	MATa/MATα	Rybník Jakubov, jihozápadní Slovensko (SLÁVIKOVÁ & VADKERTIOVÁ, 1995)	(kap. 5.3. & 5.4.)
S. cerevisiae BR-S	MATa/MATα	Domestikace kmene BR-F (KUTHAN et al., 2003)	(kap. 5.4.)

Tabulka 1: Popis kmenů *Saccharomyces cerevisiae* použitých pro studie zahrnuté v disertační práci

4.2. Výčet použitých metod

Mikrobiologické metody

Základní mikrobiologické techniky, kultivace kvasinek i bakterií, příprava širokého spektra kultivačních médií, specifické metody manipulace s kvasinkovými koloniemi, testy senzitivity k různému druhu stresorů - kapkové testy

Genové inženýrství

Genetická manipulace kvasinek (delece genů, GFP fúze, zavádění arteficiálních promotorů)

Mikroskopie

Světelná: pozorování buněk s využitím Nomarského diferenčního kontrastu

Fluorescenční: pozorování preparátů buněk s proteiny značenými GFP, či obarvených fluorescenčními barvivy (calcofluor)

Práce s DNA a RNA

PCR, izolace, separace, stanovení koncentrace, southern a northern blotting, značení DNA, reverzní transkripce, microarrays.

Práce s proteiny

Izolace, separace, stanovení koncentrace, SDS-PAGE, western blotting, imunochemické značení, barvení proteinů (stříbro, Coomassie briliant blue)

Pokročilé mikroskopické metody použité ve studiích, které jsou součástí disertační práce

Dvoufotonová konfokální mikroskopie – provedena Z. Palkovou, L. Váchovou a A. Čerňavským

Elektronová mikroskopie – environmentální skenovací mikroskopie (provedena M. Kuthanem), transmisní mikroskopie (provedena L. Štěpánkem)

Další metody

Fluorescenční spektrofotometrická měření

Průtoková cytometrie

5. Výsledky

5.1. Mezibuněčné interakce a signály při vývoji strukturovaných kolonií

Většina laboratorních kmenů kvasinek *S. cerevisiae* tvoří při růstu na pevném substrátu hladké kolonie s pravidelnými okraji bez na první pohled zřetelné diferenciace a tvorby složité trojrozměrné struktury. Oproti tomu kmeny izolované ze svého přirozeného prostředí jsou schopny tvorby strukturovaných, prostorově značně heterogenních kolonií. Významnou výjimku mezi laboratorními kmeny tvoří kmen Σ1278. Jeho původ je sice částečně podobný s většinou laboratorních kmenů, avšak podstatnou část svého genomu získal křížením s kmeny z komerční pekařské sbírky kvasinek (Yeast Foam) (MORTIMER & JOHNSTON, 1986). Kmen Σ1278 je, narozdíl od ostatních laboratorních kmenů, prototrofní a schopný například přechodu na pseudohyfální růst (tzv. dimorfické tranzice, viz kap. 3.2.3.1.1.) (GIMENO et al., 1992), tvorby strukturovaných „matů“ (REYNOLDS & FINK, 2001) a kolonií (GRANEK & MAGWENE, 2010) či exprese genu *FLO11* kódujícího povrchový adhezin (LO & DRANGINIS, 1998). Tyto vlastnosti předurčily jeho použití jako modelu pro studium procesů morfogeneze buněk. Zároveň je schopen (na rozdíl od řady přírodních kmenů) sporulace a tvorby haploidních gamet a lze ho tak využít pro studium vlivu ploidie na výše zmíněné procesy. Zajímalo nás, jaká je role buněčné morfogeneze při vývoji kolonií se složitou trojrozměrnou architekturou.

Naše výsledky prokazují, že při vývoji kolonií kmene *S. cerevisiae* Σ1278 a jeho haploidní varianty ΣS^h dochází k dvěma různým dimorfickým přechodům, které se odlišným způsobem uplatňují v různých fázích vývoje mnohobuněčného společenství. První dimorfická tranzice vede k orientovanému vláknitému růstu buněk na okrajích mikrokolonií rostoucích v těsné blízkosti a následnému srůstu mikrokolonií, jež se posléze chovají jako jedno početnější společenství. Tento jev, ke kterému dochází velmi brzy po inokulaci buněk na pevné médium a tedy nezávisle na koncentraci živin v médiu, pak skutečně závisí pouze na hustotě populace, kdy buňky solitérních mikrokolonií přechod na vláknitý růst nevykazují. V jejich případě však lze přidáním arteficiálního zdroje amoniaku a několika dalších těkavých aminů dimorfický přechod indukovat a, co je zajímavé, k takovému indukovanému vláknitému růstu buněk dochází specificky právě ve směru ke zdroji induktoru. To tedy naznačuje funkci těchto molekul při komunikaci mezi populacemi rostoucími ve vzájemné blízkosti vedoucí k jejich

pozdějšímu sjednocování. Ke druhému dimorfickému přechodu dochází v době, kdy kolonie začíná růst ve vertikálním směru a vytváří charakteristickou trojrozměrnou strukturu. Tato tranzice je, na rozdíl od raného orientovaného růstu, závislá na přítomnosti povrchového adhezinu Flo11p a dochází k ní nejen na okrajích, ale v rámci celé kolonie. Buňky postrádající gen *FLO11* nejsou schopny prodlužování buněk a jejich pseudohyfální expanze v průběhu druhé dimorfické tranzice a tím rovněž ztrácí schopnost tvorby strukturované kolonie.

Výsledky práce jsou prezentovány v následující publikaci:

(VOPÁLENSKÁ et al., 2010)

Vopálenská I., Šťovíček V., Janderová B., Váchová L., Palková Z. (2010): **Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture**. *Environmental Microbiology* **12**:264-77. IF_{2010}=5,537

VOLUME 12 NUMBER 1 JANUARY 2010 www.env-micro.com ISSN 1462-2912

environmental microbiology

Global dispersal of yeast in oak barrels

Inflation of diversity estimates by pyrosequencing errors

Tick-borne borreliae from imported reptiles

Novel phosphonate pathways in marine bacteria

WILEY-BLACKWELL

environmental microbiology

Environmental Microbiology (2010) **12**(1), 264–277 doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02067.x

Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture

Irena Vopálenská,[1†] Vratislav Št'ovíček,[1†] Blanka Janderová,[1] Libuše Váchová[2,1] and Zdena Palková[1*]

[1]*Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic.*

[2]*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic.*

Summary

Microbial populations in nature often form organized multicellular structures (biofilms, colonies) occupying different surfaces including host tissues and medical devices. How yeast cells within such populations cooperate and how their dimorphic switch to filamentous growth is regulated are therefore important questions. Studying population development, we discovered that *Saccharomyces cerevisiae* microcolonies early after their origination from one cell successfully occupy the territory via dimorphic transition, which is induced by ammonia and other volatile amines independently on cell ploidy and nutrients. It results in oriented pseudohyphal cell expansion in the direction of ammonia source, which consequently leads to unification of adjacent microcolonies to one more numerous entity. The further population development is accompanied by another dimorphic switch, which is strictly dependent on Flo11p adhesin and is indispensable for proper formation of biofilm-like aerial 3-D colony architecture. In this, Flo11p is required for both elongation of cells organized to radial clusters (formed earlier within the colony) and their subsequent pseudohyphal expansion. Just before this expansion, Flo11p relocalizes from the bud-neck of radial cell clusters also to the tip of elongated cells.

Received 12 May, 2009; accepted 11 August, 2009. *For correspondence. E-mail zdenap@natur.cuni.cz; Tel. (+420) 221951721; Fax (+420) 221951724. †These authors contributed equally to the work.

Introduction

Microorganisms growing in natural conditions usually form multicellular structures, which are highly organized and exhibit specific properties which do not arise under laboratory conditions (Palkova and Vachova, 2006). Examples are complicated biofilms causing serious problems in medical care because of their adhesion to different materials and high resistance against the chemical treatment. Multicellular colonies are another example of structures which are common in nature. Cooperation of yeast cells and their growth within a community is beneficial in harmful natural environment and might also contribute to successful colonization of the host tissue and effective struggle with the host immune response.

In spite of the fact that exact mechanisms involved remain largely unknown, three yeast capabilities are of a great significance in a community organization, development and survival. These are yeast dimorphic transition, adhesion to solid surfaces and cell–cell communication. Dimorphic transition to pseudohyphal/hyphal form was clearly documented in different yeast species including *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* (Gancedo, 2001; Sudbery *et al*., 2004). It was shown to be important for *C. albicans* biofilm maturation and colony formation (Radford *et al*., 1994) and for successful *S. cerevisiae* biofilm adhesion (Reynolds and Fink, 2001). Yeast cell ability to adhere other cells and solid surfaces is connected with production of extracellular matrix and various adhesins (e.g. *S. cerevisiae* FLO, *C. albicans* ALS, *C. glabrata* EPA families) (Dranginis *et al*., 2007). The structure of these extracellular proteins is somewhat similar, sharing the key structural elements including N-terminal domain important for specific adherence, extensively glycosylated central domain rich in Ser/Thr and C-terminal hydrophobic signal directing the GPI anchor addition. In contrast to some natural *S. cerevisiae* strains, Flo11p is not produced by most of the laboratory strains, probably due to a mutation in the gene of one of its regulators, *FLO8* (Liu *et al*., 1996). *FLO11* gene is important for both the formation of pseudohyphae in diploids and invasive growth of haploids during nitrogen and glucose limitation (Lo and Dranginis, 1998), for adhesion to plastic and the formation of mats and biofilms (Reynolds and Fink, 2001).

Successful occupation of a niche and survival under particular conditions is also dependent on ability

© 2009 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd

of microbial populations to communicate via different chemical signals, often functioning as quorum sensing molecules inducing coordinated cell behaviour. These molecules participate in formation of antimicrobials resistant biofilms causing infections either by attaching to plastic material or directly to tissues (Douglas, 2003; Juhas *et al*., 2005; Keller and Surette, 2006). Two signalling compounds farnesol and tyrosol influencing filamentation in opposite way are important in cell density sensing, dimorphic transitions and biofilm formation by *C. albicans* (Alem *et al*., 2006; Nickerson *et al*., 2006; Kruppa, 2009). A high-cell-density-induced morphogenetic switch controlled by signalling via the aromatic alcohols phenylethanol and tryptophol was recently described in *S. cerevisiae* (Chen and Fink, 2006). Furthermore, volatile ammonia is important signalling molecule in ageing colonies of various yeasts (Palkova *et al*., 1997) where it is connected with metabolic reprogramming and adaptation of the population to incoming nutrient shortage (Palkova *et al*., 2002; Vachova *et al*., 2009).

In contrast to most other laboratory strains, *S. cerevisiae* Σ1278 (and its derivatives) is capable of dimorphic transition and filamentous growth under nitrogen starvation (Gimeno *et al*., 1992). It can also bind to solid surfaces via Flo11p surface adhesin forming a biofilm-like structure (Reynolds and Fink, 2001). This, together with the fact that this strain is able to perform sexual cycle including production of viable spores (this ability is often limited in *S. cerevisiae* natural isolates), makes the strain Σ1278 very useful tool for studies of processes mentioned above, and allows also to explore differences potentially caused by different mating type.

Here, we show that *S. cerevisiae* is capable of two differently regulated dimorphic transitions from yeast to multicellular filamentous form, having distinct roles during development of yeast population. The first one is induced by volatile ammonia (or other volatile amines) and results in oriented cell growth and joining of adjacent microcolonies. It is independent of cell ploidy, nutrients and presence of yeast surface flocculin Flo11p. The second one, which occurs at the moment when young smooth microcolonies change character of their growth and start to form aerial structure, is dependent on the Flo11p and it is essential for the formation of three dimensional aerial colony architecture.

Results

Yeast cell switch from axial to unipolar growth depends on young microcolony density, but not on the nutrients

To obtain an overview on the early organization of *S. cerevisiae* population, we plated the haploid strain ΣS^h on complex glycerol medium (GMA-BKP) as 5 μl drops containing various cell numbers (C5-C50000,Table 1 and Fig. S1). For plating, we used a culture of exponentially growing ΣS^h cells in YPD medium, which contained mostly small clusters of 3–8 axially budding cells (non-separated mother–daughter cells), but also some primary axial clusters possessing elongated unipolarly budding cells.

The development of solitary microcolonies (plating C5) was always similar and independent of whether axially or unipolarly budding cell clusters were originally plated. On the agar, both formed new generations of oval axially budding cells and continued axial budding at the edge of the microcolony for at least 48 h (Fig. S1). At higher plating densities, peripheral cells of microcolonies were able to undergo dimorphic transition, switching from rounded axially budding cells to prolonged unipolarly budding cells, depending on the distance between the growing microcolonies (Table 1, Fig. S1). At densities C50000 and C5000, peripheral cells switched as early as 4 h after the inoculation and grew in all directions out of the colony. In contrast, peripheral cells of microcolonies in sparse plating (C50) switched only 24 h after the inoculation and only the cells located at the margin adjacent to the neighbouring colony(ies) were able to switch. This, specifically localized, unipolar cell-budding resulted in oriented growth of peripheral cells preferentially towards adjacent microcolony (Fig. 1A). Averaging from three independent experiments and evaluating at least 200 colonies in each, 78 ± 2% of all unipolarly budding cells (or cell-chains) at colony peripheries were markedly oriented in the direction towards the neighbouring colony.

Table 1. How the timing of dimorphic transition and medium alkalization varies with colony density.

Density of the plating	Number of cells per 5 μl drop	Timing of switch to unipolar budding (h)	Visible alkalization of the medium (h)	Initiation of the formation of aerial structure (h)
C5	1–5	48 (at least)	36–48[a]	72
C50	30–50	24	36–48[a]	55–72
C500	300–500	4–9	30[b]	50–60
C5000	3 000–5 000	4	20[b]	36
C50000	30 000–50 000	4	11[b]	24

a. Weak alkalization below the microcolony.
b. Intensive alkalization below and also around the microcolony.

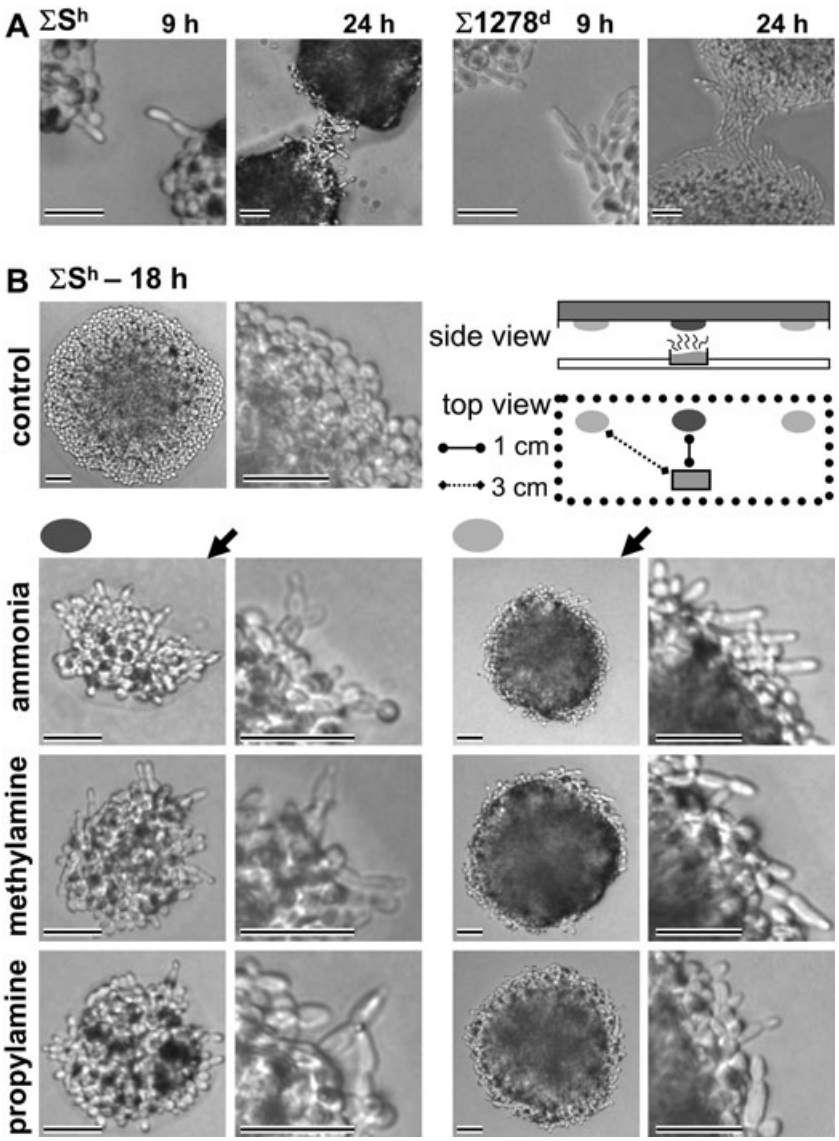


Fig. 1. Polarized growth of ΣS^h and $\Sigma 1278^d$ cells located at colony periphery, effect of ammonia and other amines.
A. Polarized growth of cells located at margins of ΣS^h and $\Sigma 1278^d$ microcolonies towards adjacent colony. Bar, 20 μm.
B. Development of ΣS^h solitary microcolonies on GMA affected by volatile ammonia, methylamine or propylamine. Control solitary microcolony growing on GMA is given for comparison. Upper right, scheme of the experimental set-up. Colonies affected by higher amine concentration denoted by dark-grey discs and those affected by lower amine concentration by light-grey discs. Black arrow indicates amine gradient orientation. Bar, 20 μm.

The timing of the dimorphic switch and development of microcolonies during the first 24 h of cultivation was independent of nutrients, which were available in surplus in the plate. Thus, as expected, development was identical when microcolonies were grown on either 1.5 mm or 3.5 mm layers of the agar medium with either 0.5% or 3% glycerol concentrations (data not shown).

Ammonia induces first dimorphic transition leading to oriented growth of neighbouring microcolonies

The obtained data indicated an intriguing possibility, that the dimorphic transition could be a result of a form of signalling between young microcolonies. This, together with our knowledge of the weak release of ammonia detected early after giant colony inoculation (Palkova *et al*., 1997), led us to analyse the possibility of ammonia being involved in this early intermicrocolony communication and in the merging of microcolonies.

Monitoring of pH changes occurring during the development of microcolonies plated on GMA-BKP revealed alkalization, the timing of which was also dependent on microcolony density (Table 1). With C50000, C5000 and C500 plating, intensive alkalization of the medium among the microcolonies was observed when the colonies had already approached each other and exhibited intensive unipolar growth (i.e. after 11, 20 and 30 h of growth respectively). With sparse plating (C50 and C5) only weak alkalization appeared under individual microcolonies after 36–48 h (Table 1).

An important question was whether an ammonia production preceded the dimorphic transition and could be involved in the induction of oriented filamentous growth or, alternatively, only unipolarly budding cells started to

produce ammonia, which consequently alkalized the colony surroundings. Hence, we shortly exposed sparsely plated ΣS^h cells to various amounts of volatile ammonia vapour. After 17–18 h, the cells of solitary microcolonies originating from ammonia-affected cells exhibited efficient unipolar budding. The efficiency of the transition was dependent on the ammonia dosage (Fig. 1B). Colonies exposed to the higher ammonia concentration were smaller in their diameter than control microcolonies growing from nonaffected cells, and contained a lot of elongated unipolarly budding cells, some of those even in central colony regions. In contrast, the solitary microcolonies exposed to lower ammonia concentrations did not exhibit a growth reduction and contained elongated unipolarly budding cells mostly at the periphery and usually facing to the ammonia source. Control colonies were always large, flat and symmetrical with smooth margins and did not contain elongated unipolarly budding cells (Fig. 1B).

As proposed previously the action of ammonia on amoebas of *Dictyostelium discoideum* could be connected with its ability to penetrate through the plasma membrane and to influence the pH of internal compartments. This could consequently be registered by cells as a signal leading to changes in cell behaviour. This hypothesis was mostly based on the finding that the effect of ammonia on *D. discoideum* development can also be elicited by other volatile amines (Davies *et al*., 1993). To explore the possibility of a similar ammonia action on yeast microcolonies, we exposed sparsely plated ΣS^h cells to the vapours of various amines and followed the efficiency of the dimorphic switch, comparing it with the induction by ammonia. Besides ammonia, which was the most potent inductor, methylamine and propylamine were able to induce the formation of unipolarly budding cells expanding from microcolonies (Fig. 1B). As with ammonia, the effect of both other amines was also dosage-dependent. In some cases we observed the polarized formation of unipolarly budding cells expanding in the direction of the amine source, thus simulating a neighbouring colony (Fig. 1B). In addition, some effect of ammonia on cell growth was observed also in liquid ΣS^h culture. Here, increased level of ammonia (but not of ammonium) induced formation of branched cell-chains (Fig. S2).

Finally, to determine whether ammonium and/or pH can influence the transition, we analysed the growth and budding pattern of solitary ΣS^h microcolonies (C5) on GMA-BKP with either the pH adjusted to 5.5 or 6.5, or with a higher NH_4^+ concentration. Both microcolonies growing at pH 6.5, or on 75 mM $(NH_4)_2SO_4$ developed unipolarly budding cells earlier than control microcolonies (Fig. 2A) and their growth was partially inhibited. The effect of ammonium supplementation was stronger and led to an earlier dimorphic transition (18 h after the inoculation) than the effect of adjusting the medium to a higher pH (36 h after the inoculation).

Oriented filamentous growth and the effect of ammonia (and of other volatile amines), ammonium and pH on the dimorphic transition in young microcolonies were not restricted to the haploid ΣS^h strain; we obtained similar results with the diploid $\Sigma 1278^d$ strain (Fig. 1A, Figs S3 and S4A). The observed difference between the ΣS^h and $\Sigma 1278^d$ strains was mostly in terms of the morphology of the cells and unipolarly budding filaments, but not of the process of initiating their formation. As also described previously (Roberts and Fink, 1994), the cells and pseudohyphae of $\Sigma 1278^d$ were always longer and more branched than the elongated cells and filaments of ΣS^h. It also disabled to distinguish possible effect of ammonia on $\Sigma 1278^d$ pseudohyphae in liquid culture (data not shown).

Early dimorphic transition of young microcolonies growing on SLAD medium is stimulated by increased ammonium level

As shown above, a higher concentration of ammonium in GMA-BKP effectively potentiated the early switch of both ΣS^h haploid and $\Sigma 1278^d$ diploid strains to unipolar growth and pseudohyphae formation. In contrast, Gimeno and colleagues (1992) showed that diploid Σ1278-derived cells switch to pseudohyphal growth (leading to the radial expansion of cells from the colonies in all directions) when growing on low ammonium glucose SLAD medium (synthetic dextrose medium with 0.05 mM ammonium sulfate). On the other hand, colonies growing on SLAD in the presence of the standard level of ammonium [7.6 mM $(NH_4)_2SO_4$] had smooth margins without pseudohyphae (Gimeno *et al*., 1992). To find out whether this discrepancy was caused by the different cultivation conditions (complex glycerol GMA versus SLAD glucose minimal medium) or, more interestingly, by the different physiology of cells occurring in different growth phases, we compared the effect of various concentrations of $(NH_4)_2SO_4$ added to SLAD agar on the early dimorphic transition. In both $\Sigma 1278^d$ and ΣS^h strains, the addition of $(NH_4)_2SO_4$ to concentrations of 7.6 mM, 37.9 mM or 75.7 mM did not prevent the early switch to pseudohyphal growth (Fig. 2B, Figs S4B and S5A). In fact, $\Sigma 1278^d$ pseudohyphal growth was very pronounced on SLAD agar with 7.6 mM ammonium sulfate, where pseudohyphae were formed as early as 18 h after the inoculation of a solitary microcolony (Fig. 2B). At higher $(NH_4)_2SO_4$ concentrations (37.9 mM and 75.7 mM) in SLAD, the $\Sigma 1278^d$ microcolonies formed long branched pseudohyphae (data not shown). ΣS^h formed elongated unipolarly budding cells with the same pattern (data not shown). These data fully agreed with our observations on the early dimorphic transition on glycerol

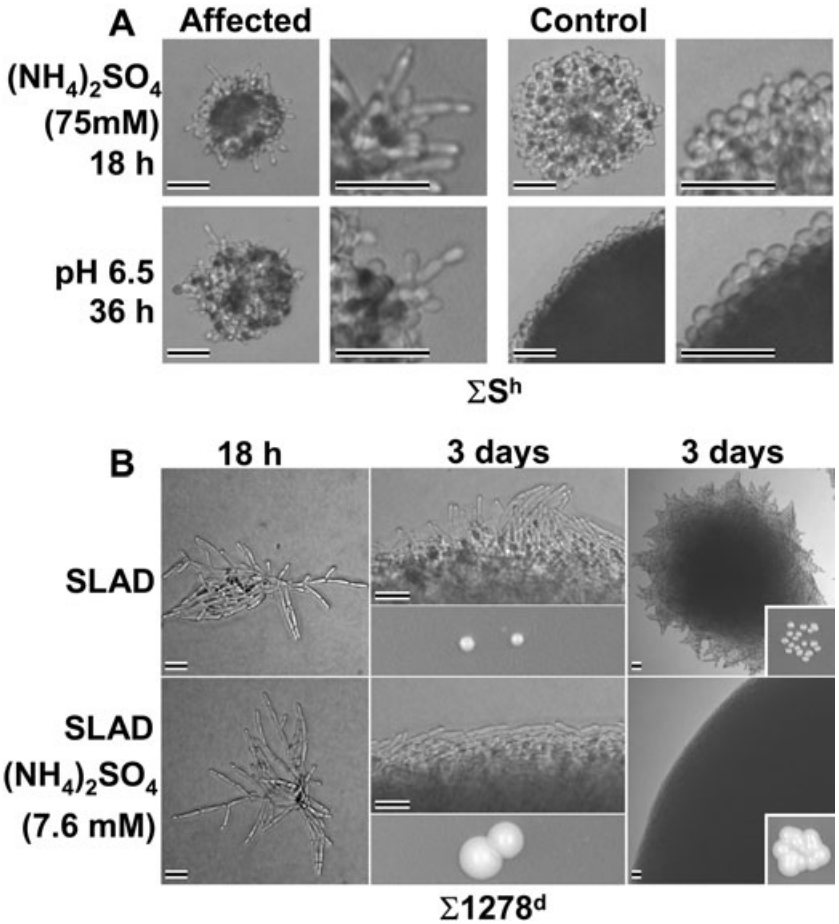


Fig. 2. Effect of ammonium and pH on development of young solitary microcolonies.
A. Development of ΣS^h solitary microcolonies on GMA affected either by higher ammonium sulfate concentration in or higher pH of GMA. Control solitary microcolonies growing on GMA are given for comparison.
B. Development of $\Sigma 1278^d$ solitary microcolonies on SLAD agar with (bottom row) or without (upper row) 7.6 mM ammonium sulfate. Bar, 20 μm.

GMA-BKP and proved that also on glucose SLAD agar with a standard level of ammonium [7.6 mM $(NH_4)_2SO_4$], the cells of microcolonies undergo the early dimorphic transition to unipolar growth with high efficiency. The development of older colonies on SLAD and SLAD with 7.6 mM $(NH_4)_2SO_4$ (Fig. 2B and 3-day-old colonies) corresponded to previous observations (Gimeno *et al.*, 1992), thus confirming identical strain behaviour under the growth conditions used. $\Sigma 1278^d$ pseudohyphal growth in liquid SLAD was not affected by changes in ammonium level (Fig. S5B).

Second dimorphic transition occurs during development of wrinkled aerial structures

Both solitary-developing microcolonies and microcolonies within a group (performing ammonia-induced dimorphic transition of margin cells, see above) were smooth until the time when the first wrinkled aerial structures started to appear (Fig. 3B, Video S1). The exact timing of wrinkle appearance was dependent on microcolony density, i.e. densely plated microcolonies formed wrinkles earlier than solitary microcolonies (Table 1). The formation of wrinkles was accompanied by second dimorphic transition as shown in Fig. 3C. The smooth ΣS^h microcolonies were composed of rounded and elongated cells organized to small radial clusters (Fig. 3C, a–c). Later the number of elongated cells increased; however, they remained attached in the radial clusters (Fig. 3C, d). In contrast to elongated cells and pseudohyphae induced by ammonia, which were mostly localized at colony margin, these clustered cells were spread throughout the smooth colony. At the time just before wrinkle formation, new cells growing unipolarly out of the clusters appeared and were able to develop to relatively long pseudohyphae (Fig. 3C, e). This process appeared independently of microcolony density, thus suggesting that the ammonia-induced early dimorphic transition of peripheral cells was not a prerequisite of wrinkle formation. However, as shown below, early dimorphic transition influenced the structure of giant fluffy colony developing from joined microcolonies.

A cursory glance at structured ΣS^h fluffy giant colony developed by joining of a group of microcolonies did not show any precise wrinkle organization. However, when following the process of microcolony joining and wrinkle

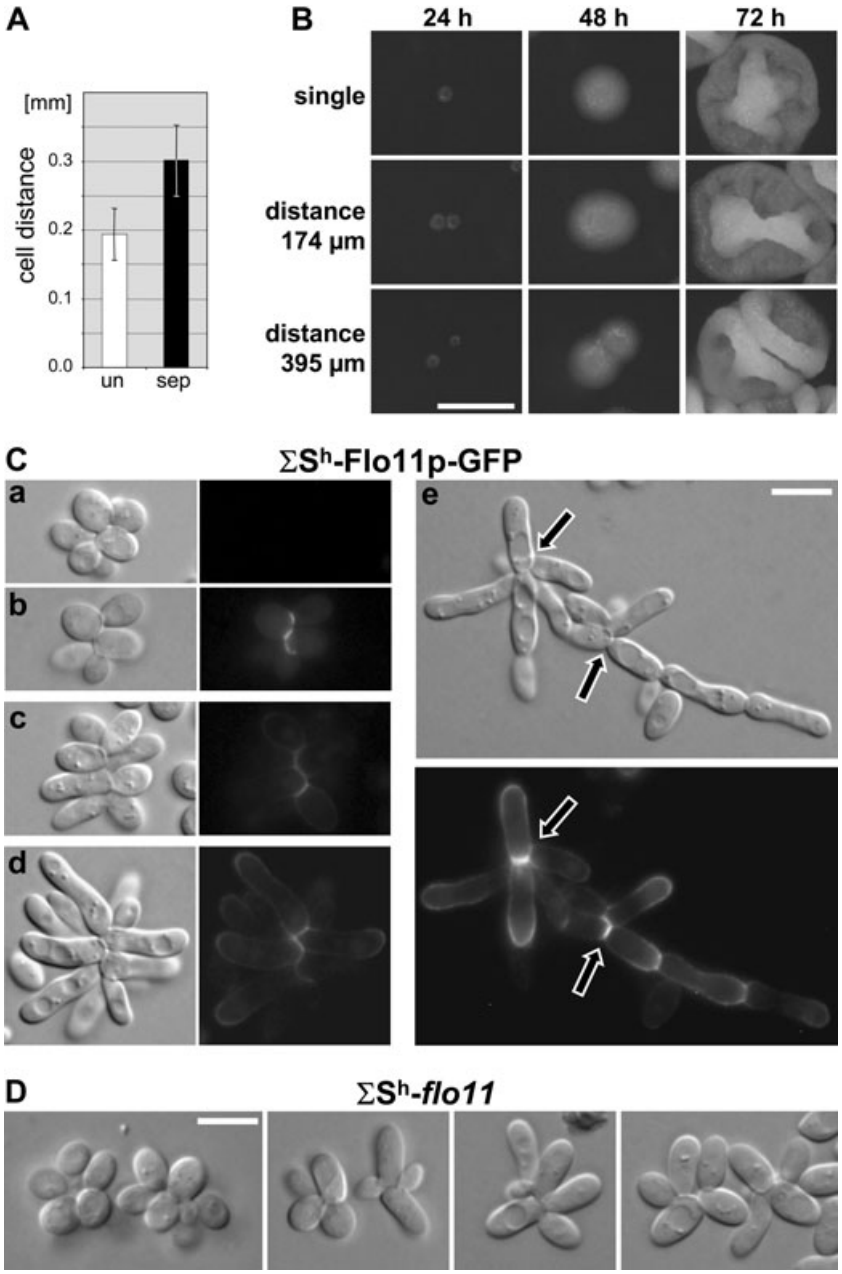


Fig. 3. Development of aerial structure depends on second dimorphic transition and Flo11p.
A. Maximal distance between inoculated cells leading to formation of unified colonies (un) and minimal distance between inoculated cells, which develop to separated colonies (sep).
B. Development of wrinkles on the border of solitary microcolony, on unified microcolony originated from two cells 174 µm distant and on individually developing microcolonies (from two cells 395 µm distant). Bar, 1 mm.
C. Examples of radial clusters from young ΣSʰ-Flo11p-GFP microcolonies. Some Flo11p-GFP containing clusters of mostly oval cells (b) can be observed among majority of Flo11p-GFP non-producing clusters (a) already in 9-hour-old densely plated microcolonies. The number of clusters formed by elongated cells (c and d) increases from 24 to 48 h of microcolony development (C50-C500). White-black arrows mark centres of the two radial cell clusters (harvested from 48 h old microcolonies, C500), from which pseudohyphae started to expand (e). Cells visualized by Nomarski contrast and GFP-fluorescence of Flo11p-GFP are shown. Bar, 5 µm.
D. Radial clusters from 48 h old ΣSʰ-*flo11* microcolonies (C50-C500). Neither largely elongated cell clusters (see Cd for ΣSʰ-Flo11p-GFP) nor pseudohyphae are present. Bar, 5 µm.

formation, some regularity was found. The solitary growing microcolony usually first developed a circular wrinkle on its periphery and sometimes one central wrinkle in parallel (Fig. 3B and Video S1). However, wrinkle development on microcolonies growing in a crowd was strictly dependent on microcolony distance. Those microcolonies grown from cells plated closer than 0.2 mm joined within the first 24 h and consequently behaved as one entity and developed common wrinkles at their periphery and central region (Fig. 3A and B; Video S1, green arrow). In contrast, those microcolonies arising from more distant cells, which join only several hours later, remained separated and each formed its own wrinkle (Fig. 3B; Video S1, red arrow). Thus, the original dissemination of microcolony stirps was important for the resulting wrinkle development of neighbouring microcolonies: they either unified and developed further as one entity, or remained as autonomous microcolonies.

After aerial wrinkle formation, the subsequent development of the typical fluffy colony structure continued over several days. During this period, no newly formed wrinkles were observed at the colony periphery and the development proceeded inside the colony by increasing the size, waving, and sometimes by joining and splitting already formed wrinkles, which often did not have enough space to grow further horizontally (Video S1).

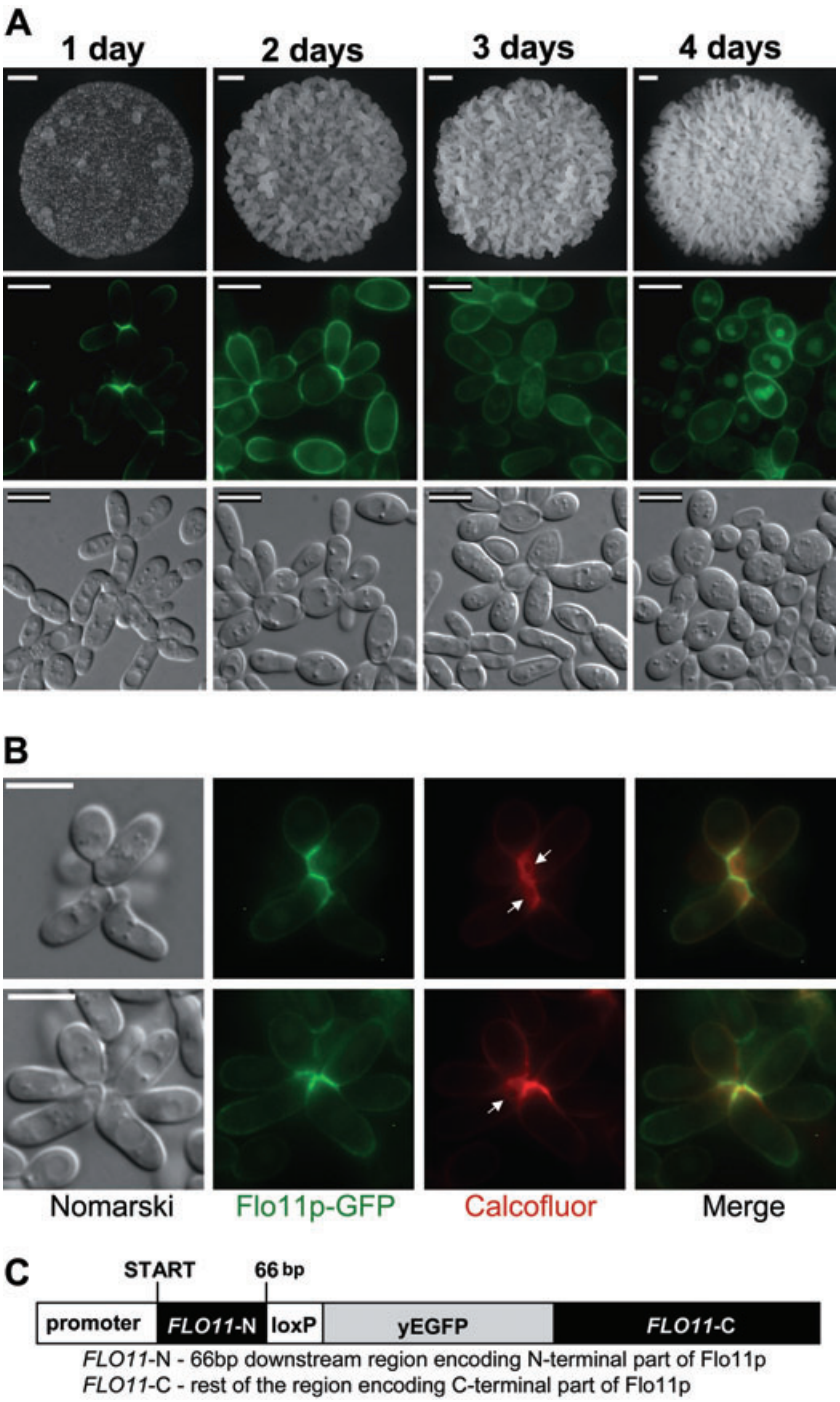


Fig. 4. Localization of Flo11p-GFP in cells of older ΣS^h-Flo11p-GFP colonies.
A. Changes in Flo11p-GFP localization during development of densely (C50000) plated microcolony population forming consequently giant colony. Initial Flo11p-GFP appearance at bud-neck regions and consequently at the tip of elongated cells correlates with the initiation of the formation of aerial structure (day 1); Flo11p-GFP localizes to the whole cell surface during the period of intensive formation of wrinkles (day 2); Flo11p-GFP level gradually decreases during days 3–4 and the GFP signal appears in the vacuoles (day 4). Colonies, bar, 1 mm; cells, bar, 5 μm.
B. The 24-hour-old ΣS^h-Flo11p-GFP stained with Calcofluor white. Flo11p-GFP colocalizes with calcofuor to bud-necks of radial clusters, but it does not localize to scar-rings (white arrow). Green, GFP; red (false colour), Calcofluor white. Bar, 5 μm.
C. Scheme of *FLO11* gene tagged with loxP-GFP module in the genome of ΣS^h-Flo11p-GFP strain.

Flo11p surface flocculin is not involved in the first dimorphic transition leading to oriented growth and initial area colonizing, but it is essential for second dimorphic transition and aerial structure formation

To be able to evaluate the possible role of Flo11p during the development of ΣS^h microcolonies, we constructed a ΣS^h-Flo11p-GFP strain containing the *FLO11* gene fused with the GFP gene directly in the genome, i.e. under the control of its own promoter. In this construct, the GFP gene was introduced after the *FLO11* signal sequence to ensure that both the secretion sequence and C-terminus, important for GPI-anchor tagging, were preserved (Fig. 4C). In the resulting ΣS^h-Flo11p-GFP strain, the Flo11p-GFP protein properly localized to the cell surface and ΣS^h-Flo11p-GFP colony morphology and develop-

ment was identical to that of the ΣS^h colony (Fig. 4A). In parallel, we prepared the isogenic ΣS^h-*flo11* strain lacking a functional *FLO11* gene.

In young microcolonies, the first visible production of Flo11p-GFP was dependent on plating density. The initial Flo11p-GFP fluorescence was observed as early as 9 h after C50000 plating and as late as approximately 36 h when solitary microcolonies (C5) were plated. The first visible Flo11p-GFP fluorescence signal was never spread over the cell surface, but always specifically localized to the area of the bud neck of either rounded or elongated cells (Fig. 3C, b,c). Hence, strong Flo11p-GFP signal was visible at the joining site of the cell clusters within smooth microcolonies. Calcofluor white staining of scars of ΣS^h-Flo11p-GFP cells showed colocalization of GFP and Calcofluor in the joining sites of the clusters (Fig. 4B). Flo11p-GFP, however, never exhibited scar ring localization, which was often visible for the Calcofluor. This suggests that Flo11p localizes to the sites of the division, but it does not encircle emerging buds. As cells became more elongated, Flo11p-GFP started to appear at opposite site, i.e. at the cell tip (Fig. 3C, d). Approximately one day after the first visible Flo11p-GFP appearance, the second dimorphic transition to pseudohyphal growth and the aerial structure organization were initiated. In parallel, Flo11p-GFP signal at the tip intensifies and later becomes spread to the whole surface of elongated cells, in some cells still being the most intensive in the bud-neck regions (Fig. 3C, e; Fig 4A, 2 and 3 days).

In colonies with fully developed wrinkles (e.g. 3–4 days old, C50000 plating), the cell surface Flo11p-GFP fluorescence became weaker and a relatively strong GFP signal appeared in the vacuoles (Fig. 4A), indicating that a fraction of the surface Flo11p-GFP was probably removed by endocytosis. As the colony population became more heterogeneous in this period, it also contained rounded cells with an intense Flo11p-GFP signal on their surface (Fig. 4A). In aged 8-day-old colonies, cells in central areas were mostly oval and rounded with weak surface-localized Flo11p-GFP and a vacuolar GFP signal, while cells forming colony margin still contained, besides a vacuolar, a strong GFP signal on their surface (data not shown).

Analysis of the development of young ΣS^h-*flo11* microcolonies revealed that both the initial dimorphic transition to unipolar budding and the oriented growth towards neighbouring colonies were not affected by the absence of Flo11p (Fig. 5A). However, the subsequent organization of the aerial structure was completely abolished and the ΣS^h-*flo11* strain developed only smooth colonies (Fig. 5C). Likewise parental strain microcolonies, young ΣS^h-*flo11* microcolonies were also composed of radial clusters of oval and short elongated cells (Fig. 3D), which, however, never reached the length of parental cells having Flo11p-GFP localized at the tip (Fig. 3C, d). In addition, ΣS^h-*flo11* clusters were usually composed of fewer cells than those of the parental strain. The second dimorphic transition leading to pseudohyphae formation was completely abolished and older (2–3 days old) ΣS^h-*flo11* smooth colonies were thus formed mostly by oval cells (Fig. 5D). In addition, presence of Flo11p was essential for cell attachment to the agar (Fig. 5B). Some cells attached to the agar appeared even in 9-hour-old densely growing ΣS^h microcolonies, i.e. in colonies, which already contained some cells with Flo11p-GFP signal. The attachment intensified in ΣS^h smooth colonies just before the second transition and wrinkle formation. In contrast, almost no cells remained attached to the agar after washing of ΣS^h-*flo11* microcolonies (Fig. 5B). In this developmental stage, smooth ΣS^h-*flo11* microcolonies started to be more flat than those of the ΣS^h strain, showing that the three-dimensional organization of microcolonies was disrupted by the absence of Flo11p (Fig. 5B).

Discussion

Our study revealed that territory colonizing and organization of *S. cerevisiae* population into structured colony are dependent on the two differently regulated events of dimorphic transition (Fig. 6). Early development of both the haploid ΣS^h and diploid Σ1278^d significantly differs when an individual cell grows and divides in isolation, or if more cells are present in proximity. Solitary cell forms a smooth-edge microcolony, without any unipolarly budding filaments on its margin. In contrast, when more cells occurring in proximity form microcolonies, the cells of their margin quickly switch to unipolar budding and form elongated cells or pseudohyphae preferentially oriented mutually towards the neighbour. The rate and efficiency of this ploidy-independent dimorphic change and oriented growth is dependent on population density and it is very probably induced by cell–cell communication among the developing microcolonies. This early dimorphic transition to the unipolar oriented growth is entirely different from the transition of diploid Σ1278 cells to pseudohyphae in older colonies grown on SLAD agar (Gimeno *et al*., 1992; Fig. 2B, 3-day-old colonies) as well as from high-cell-density-induced morphogenetic switch controlled by the aromatic alcohols phenylethanol and tryptophol (Chen and Fink, 2006). Both these previously described events occur under conditions of nitrogen starvation. In contrast, cell unipolar growth out of the colonies can be induced by volatile ammonia as well as by other volatile amines. It can be potentiated by increased ammonium concentration in the medium and less efficiently also by increase in the medium pH. These findings, together with the detection of ammonia produced shortly after giant colony

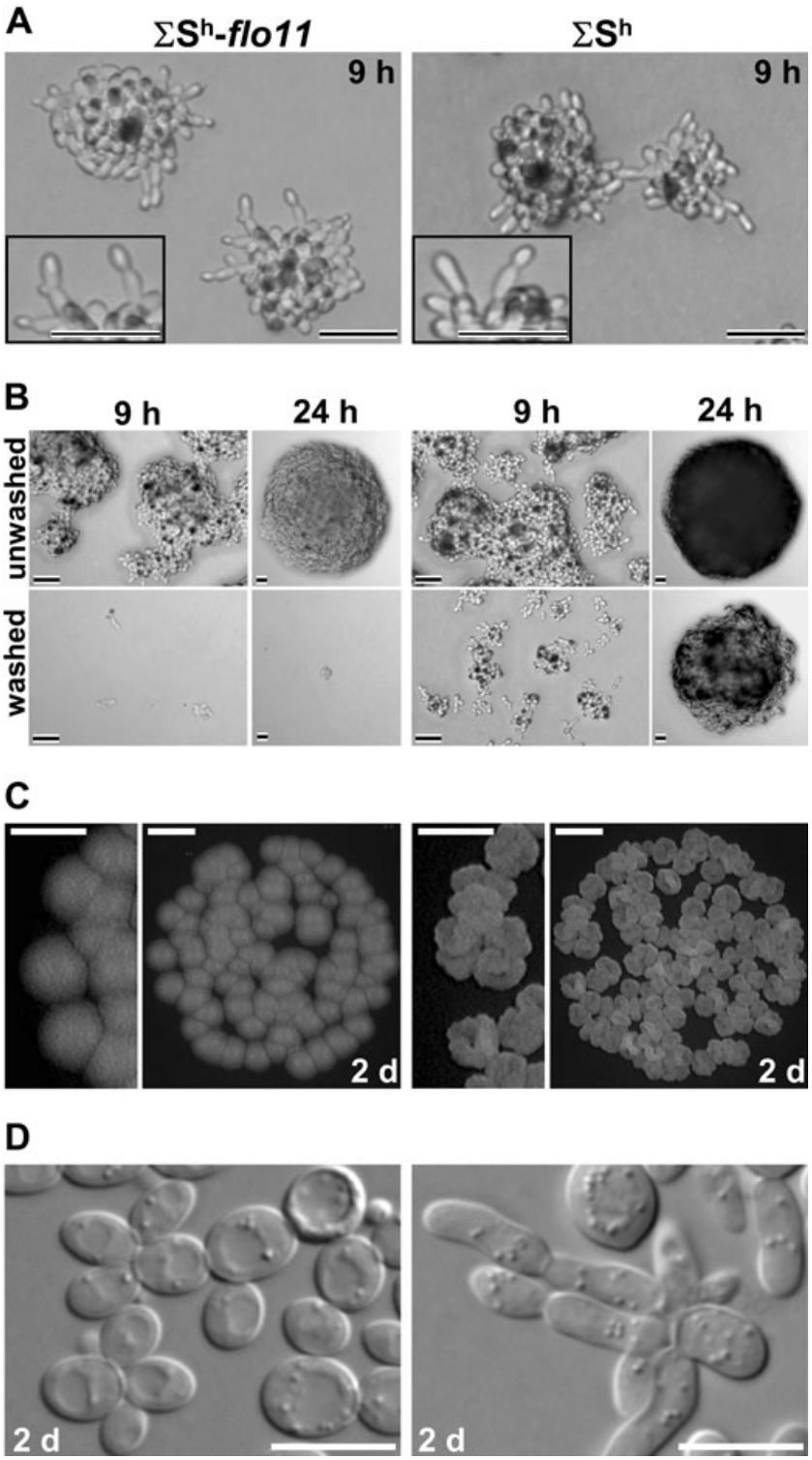


Fig. 5. Absence of Flo11p affects distinct phases of colony development in different ways.
A. ΣSʰ-*flo11* (left) undergoes early dimorphic transition and exhibits oriented unipolar growth like the parental ΣSʰ (right).
B. ΣSʰ-*flo11* microcolonies are more flat than ΣSʰ microcolonies. Their cells lack the ability to adhere the agar (washed). Left, densely (C50000) plated 9-hour-old microcolonies; right, solitary (C50) plated 24-hour-old microcolonies.
C. ΣSʰ-*flo11* microcolonies (left) are defective in the formation of aerial structure as compared with ΣSʰ microcolonies (right).
D. The cells of ΣSʰ-*flo11* microcolonies (left) are more rounded than cells of ΣSʰ microcolonies (right). Black-white bar, 20 μm; white bar (cells), 5 μm; white bar (colonies), 1 mm; d, day.

inoculation (Palkova *et al*., 1997) and observation that ammonia induces formation of cell-chains in liquid GM, strongly support the hypothesis that volatile ammonia itself could function as the signalling molecule, which induces oriented unipolar growth in young microcolonies (Fig. 6). The finding that other volatile amines can substitute ammonia function suggests that mechanism of its action could be connected with pH changes of internal cellular compartments (e.g. vacuoles) similarly as it was proposed for *D. discoideum* (Gross *et al*., 1983).

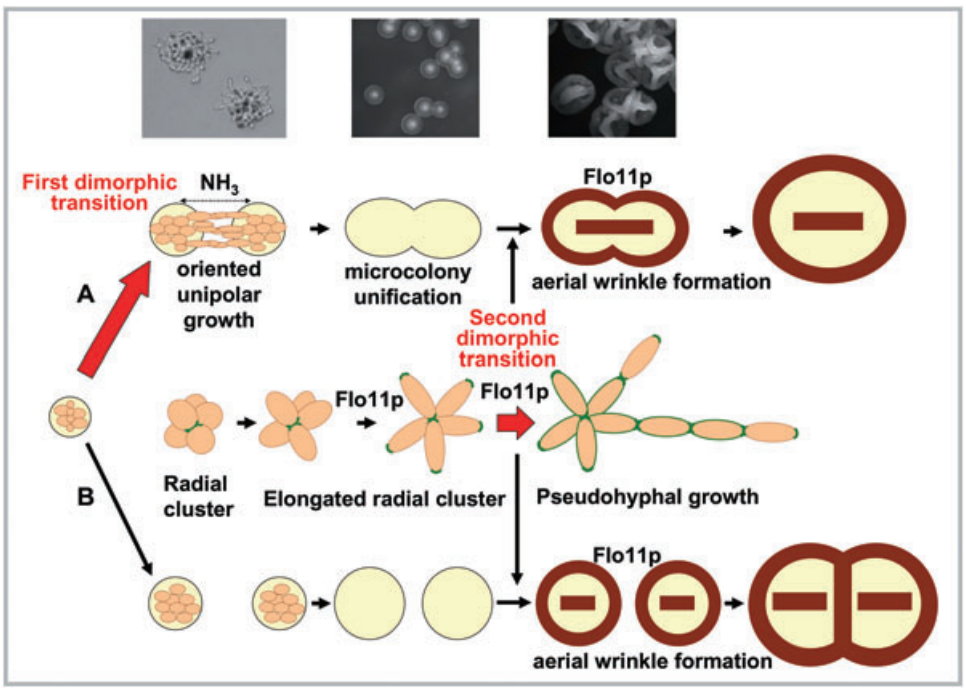


Fig. 6. The scheme of regulation and roles of the two distinct dimorphic transitions during *S. cerevisiae* territory colonizing and population development. Development of either colonies growing in tight proximity (A) or colonies, which are more distant (B). Important role of ammonia in the transition to unipolar budding and oriented growth (first dimorphic transition) as well as essential role of Flo11p in cell elongation and formation of aerial structure (second dimorphic transition) are depicted. The development of radial clusters within whole microcolonies in both (A) and (B) is indicated in central part of the scheme. Red arrows indicate two distinct dimorphic transitions. Brown lines/contours indicate position of wrinkles.

In contrast to the natural situation where ammonia is produced by sparse microcolonies, treatment with a high-dose uniform artificial ammonia cloud or excess of ammonium in the medium leads to the non-oriented formation of unipolarly budding cells from the colony in all directions, similarly to the behaviour under conditions of high density plating. Thus, one can hypothesize that the small amount of ammonia produced by neighbouring colonies forms a gradient, which is mutually sensed by microcolonies and induces the oriented unipolar growth of their cells. In an excess of the signalling molecule, the gradient is destroyed and cells grow unipolarly in all directions from the colony. This is supported by finding that asymmetric pulse of ammonia or other volatile amine applied on sparsely plated microcolonies leads to asymmetrically localized unipolarly budding cells on the colony side oriented towards the ammonia source (Fig. 1B and Fig. S3). Similar yeast behaviour has been described during the mating of haploid cells of opposite mating type. Also there, the proper concentration of the pheromone arriving at cells in the form of an oriented gradient is required for proper shmoo orientation and highly efficient mating (Jackson and Hartwell, 1990). Characteristics of the ammonia-induced dimorphic transition of cells plated at high density resemble those of the quorum-sensing phenomenon, where autoregulatory molecules released in a cell density-dependent fashion cause a coordination of whole community behaviour (Bassler, 2002). Nevertheless, as current techniques do not enable us to directly monitor the gaseous ammonia gradient produced by individual microcolonies, definitive proof of its effect in a natural environment remains to be found.

The above data imply an intriguing question, why small microcolonies growing in relative proximity have evolved the system (Fig. 6), which allows them not only to find their surrounding neighbours, but also to grow towards them and not onto a free, nutrient-rich space. In contrast to the previously described behaviour of much older colonies, in which the initiation of ammonia production by nutrient shortage leads to colony growth towards areas of less nutrient competition (Palkova *et al*., 1997), these small young microcolonies are still growing in nutrient excess. Thus, it seems that in this early developmental stage neighbouring dividing yeast cells and small microcolonies prefer to unify to form a more numerous community, which consequently develops and behaves synchronously. This strategy could be advantageous for at least two reasons. First, under natural conditions, more cells should have more chance to survive than fewer cells. This can be advantageous for yeast colonizing the host

organism or forming a biofilm, where quick occupation of a territory by numerous cooperating cells brings better protection against host immune system and/or allows quick formation of extracellular matrix protective layer. Second, unification into one structure prevents the possible subsequent competition for space and nutrients since after the unification, the cells of original microcolonies develop regularly within one multicellular community. This can be supported by observation that the unification of small adjacent microcolonies can occur only before the first wrinkles start to form on their surface. Then the unification is confirmed by the formation of one common wrinkle surrounding the unified microcolonies, while non-unified microcolonies each form their own wrinkle (Fig. 3, Video S1). In contrast to unified microcolonies, clear space competition is visible among wrinkle-separated colonies (Video S1) over the next few days. From this point of view, oriented growth of non-motile yeast cells can, to some extent, substitute the aggregation capabilities of motile bacteria (or other microorganisms), important for various forms of social microbial behaviour (Shimkets, 1990).

Early dimorphic transition and oriented growth occur predominantly at margin regions of adjacent microcolonies independently of Flo11p flocculin. On the contrary, Flo11p is required for the second dimorphic transition, which occurs throughout the whole microcolonies and leads to the formation of aerial structure (Fig. 6). This is documented by finding that ΣS^h-*flo11* cells fail to form pseudohyphal cells arising from the radial clusters and they do not create aerial structure, although their young microcolonies are able to switch from axial to unipolar budding and to perform oriented growth. Aged ΣS^h-*flo11* smooth colonies are composed of mostly rounded cells. Hence, Flo11p is apparently indispensable for both elongation of cells in the clusters and consequent dimorphic transition to pseudohyphal growth of cells forming wrinkles. It also participates in (but it is not essential for) cell–cell adhesion within the radial cluster (ΣS^h-*flo11* clusters usually contain fewer cells than ΣS^h clusters). Polarized localization of GFP-tagged Flo11p to the bud neck of axially and unipolarly budding cells and its later appearance also at the tip of elongated cells resembles localization of various proteins involved in establishment of yeast cell polarity (Madden and Snyder, 1998; Cullen and Sprague, 2002) and suggests a similar role of Flo11p. Later, during formation of wrinkles, i.e. during the process which is strictly dependent on Flo11p presence, the amount of Flo11p-GFP increases and it spreads to the whole cell surface. Interestingly, in already developed wrinkles, asymmetric Flo11p localization at the bud-neck and at the tip is still visible in some elongated cells, while more rounded cells have Flo11p spread over the whole surface. These data suggest that Flo11p may be directly involved in the process of initiation of aerial structure formation and regulation of cell-oriented growth from the radial clusters and arrangement of cells within the three-dimensional colony structure. At later phases Flo11p may be also involved in the attachment and interconnection of elongated and rounded cells within the wrinkles. This is supported by observation that Flo11p is indispensable for attachment of massive number of cells to the surfaces (Fig. 5B) as also described previously (Reynolds and Fink, 2001).

Our discovery of nutrient- and Flo11p-independent dimorphic transition induced in conditions of high nitrogen independently on carbon source indicates as yet unknown possibilities of *S. cerevisiae* behaviour under natural conditions. Dimorphic transition of *S. cerevisiae* cells was until now doubted for nitrogen- and glucose-rich serum (Crispens, 1975) or even ruled out for older yeast populations grown on nitrogen-rich agar plates (Gimeno *et al.*, 1992). The finding of ammonia as inducing agent implies that increase in pH shifting ammonium/ammonia ratio in favour of ammonia (Palkova and Vachova, 2003) can potentiate dimorphic transition, and thus could help yeast to colonize particular niche. Ammonia (or possibly some volatile amines) can even function as an attractant inducing oriented yeast growth towards the ammonia producer, e.g. either wounded fruit or particular tissue of a host organism. Fruits can release NH_3 by the action of phenylalanine-ammonia lyase, which is activated by a wound (Kato *et al.*, 2000) or during ripening (Gatto *et al.*, 2008). In mammals, brain is the organ where ammonia/ammonium metabolism plays important role and, interestingly, it is the organ in which *S. cerevisiae* survive the best at least in CD-1 mice (McCusker, 2006).

Experimental procedures

Strains

The *S. cerevisiae* diploid strain $\Sigma 1278^d$ (a/α) was obtained from H. Sychrová (AS CR, Prague, Czech Republic); its haploid derivative ΣS^h (a) was obtained by sporulation (Vopalenska *et al.*, 2005). ΣS^h-*flo11* (a, *flo11::kan*^{r}) and ΣS^h-Flo11p-GFP (a, *FLO11*-GFP) strains were prepared in this study.

Media and cultivation

Yeast liquid cultures were grown in YPD (1% yeast extract, 1% pepton, 2% glucose), GM (1% yeast extract, 3% glycerol), YPGal (1% yeast extract, 1% pepton, 2% galactose) and liquid SLAD (Gimeno *et al.*, 1992). For liquid culture experiments, the exponential cells grown in YPD medium were diluted to an A_{600} of 0.01 into GM or liquid SLAD medium with supplements and adjustments described below. Colonies were grown on GMA (GM with 2% agar), on GMA-BKP (GMA supplemented with the pH indicator bromcresol purple (BKP) to a final concentration of 0.01%; pH 5.2) or on SLAD

agar (Gimeno *et al*., 1992) at 28°C. When required, the media were supplemented with either 200 μg ml^{-1} Geneticin (GMA-G418) (Sigma-Aldrich) or 10 μg ml^{-1} Phleomycin (GMA-Phleo) (InvivoGen), or the following adjustments were made: (i) lowering the glycerol concentration in GMA-BKP to 0.5%; (ii) supplementation of GM and GMA-BKP with $(NH_4)_2SO_4$ to final concentrations of 50 and 75 mM respectively; (iii) supplementation of GM with 7.6, 50 and 100 mM $(NH_4)_2SO_4$ and modifying the pH to 7.3 with 1 M NaOH; (iv) modifying the initial GMA-BKP pH to 5.5 or 6.5 with 1 M NaOH; and (v) liquid SLAD and SLAD agar supplementation with $(NH_4)_2SO_4$ to final concentrations of 7.6, 37.9 or 75.7 mM. BKP changes colour from yellow (pH ≤ 5.2) through violet (pH 6.5) to purple (pH ≥ 6.8).

Determination of cell budding pattern

The budding pattern of the cells from liquid medium or in colonies was ascertained by evaluating the cell arrangement in cell clusters. When required, the budding pattern was confirmed by staining the bud scars with 0.2 μM Calcofluor white (Vopalenska *et al*., 2005). The proportion of unipolarly budding cells and pseudohyphal cells on the periphery of young microcolonies was followed *in situ*. The presence of these cells in wrinkles or inside the microcolonies was determined by evaluating cells harvested from microcolonies.

Exposure of cells to ammonia or amine vapour

Ammonia was generated in a small vessel containing 1 M NH_4Cl in 1 M NaOH (Palkova *et al*., 1997). 1 M methylamine or 1 M propylamine was prepared from 12 M stock solutions (Sigma) diluted in H_2O in the vessel. The vessels were placed near the agar as indicated in the scheme in Fig. 1B for 15 min, 1 h after plating the cells on GMA.

Construction of ΣS^h-Flo11p-GFP strain

The LoxP-GFP module was inserted behind the 66th bp downstream of the *FLO11* coding region (Fig. 4C) using internal tagging as described (Gauss *et al*., 2005). The loxP-kanMX6-GFP transformation module was amplified by PCR from plasmid pOM40 (containing the kanMX6 marker and GFP tag) using PPP Master Mix (TopBio) and the primers MA1 (gcttatttggtcctttcgcttctatttaactcggctttgggtttttgcaggtcgac aacccttaat) and MA2 (acagctagttccttcggaggatcctcttggaacta gtgcagttgggcggccgcataggccact). Transformants were selected on GMA-G418. The kanMX6 marker was removed by transforming the cells with plasmid pSH65 (containing Cre-Recombinase and the ble^r marker gene) as described (Gueldener *et al*., 2002). Positive transformants were selected on GMA-Phleo plates. Cre expression was induced by shifting the cells grown overnight in YPD to YPGal (both media supplemented with 10 μg ml^{-1} Phleomycin) for 2 h. Approximately 200 cells were then plated on GMA and cells, which lost kanMX6 were detected by replica plating onto GMA-G418. Selected clones were examined under the fluorescence microscope and the integration of the loxP-GFP module was verified by colony PCR (Gauss *et al*., 2005).

Deletion of FLO11 gene

Deletion of the *FLO11* gene was performed using a disruption cassette, as described (Gueldener *et al*., 2002). The cassette was amplified by PCR with primers DEL1 (ttaaaatatacttt tgtaggcctcaaaaatccatatacgcacactcagctgaagcttcgtacgc) and DEL2 (atgaaaacatcgtaatgaagaaacgaacatgttggaattgtatcagca taggccactagtgga) homologous to the flanking regions of *FLO11* ORF and complementary to plasmid pUG6 (containing kanMX6 marker gene) or plasmid pUG66 (containing ble^r marker gene). The cassette was transformed into yeast cells and positive transformants were selected on GMA-G418 or GMA-Phleo plates. Selected clones were then examined by colony PCR for the presence of the kanMX6 or ble^r marker integrated instead of the *FLO11* gene.

Yeast transformation

ΣS^h cells were transformed as described (Gietz and Woods, 2002). Before plating on selection medium (GMA-G418 or GMA-Phleo), cells were incubated for 3 h in YPD at 28°C with shaking. Plates were incubated at 28°C for 4 days.

Photography of colonies and cells

Larger colonies were photographed with illuminating light from above. A HITACHI HV-C20 colour camera with Cosmicar or Navitar objectives was used, along with a Fiber-Lite PL-800 and Kaiser Prolite illumination system and NIS-Elements AR 2.30 software (Laboratory Imaging). The time-laps experiments documenting colony development (for video acquiring) were performed using camera Nikon DS-5M with objective Navitar 12× Zoom 12:1 with led diode illumination, operated by time-lapse image recording NIS-elements system (Laboratory Imaging). The cells and young microcolonies were photographed with a high performance CCD camera (Cohu) and microscope (Leica DMR) with a 10×, 20× or 40× objective. Cells with Flo11p-GFP were evaluated under an HCX PL fluotar 100×/1.3 oil objective with a GFP filter, when stained with Calcofluor white with a UV filter (excitation 340–380 nm) and under Nomarski contrast with Leica DMR.

Acknowledgements

We thank D. Maišaidrová for excellent technical assistance. This study was supported by grants from the Grant Agency of Academy of Sciences IAA500200506, Grant Agency of the Czech Republic 204/08/0718 and from the Ministry of Education (LC06063 and LC531, Research Concepts MSM0021620858 and AV0Z50200510) and by the Howard Hughes Medical Institute International Research Award (#55005623 to Z.P.).

References

Alem, M.A., Oteef, M.D., Flowers, T.H., and Douglas, L.J. (2006) Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell* **5:** 1770–1779.

Bassler, B.L. (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109:** 421–424.

Chen, H., and Fink, G.R. (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* **20:** 1150–1161.

Crispens, C.G. (1975) Section IV: Blood. In *Handbook of the Laboratory Mouse*. Springfield, IL, USA: Charles C. Thomas Pub. Ltd., pp. 93–123.

Cullen, P.J., and Sprague, G.F. Jr (2002) The roles of bud-site-selection proteins during haploid invasive growth in yeast. *Mol Biol Cell* **13:** 2990–3004.

Davies, L., Satre, M., Martin, J.B., and Gross, J.D. (1993) The target of ammonia action in dictyostelium. *Cell* **75:** 321–327.

Douglas, L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11:** 30–36.

Dranginis, A.M., Rauceo, J.M., Coronado, J.E., and Lipke, P.N. (2007) A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev* **71:** 282–294.

Gancedo, J.M. (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25:** 107–123.

Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., *et al.* (2008) Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J Agric Food Chem* **56:** 11773–11785.

Gauss, R., Trautwein, M., Sommer, T., and Spang, A. (2005) New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22:** 1–12.

Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350:** 87–96.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth – Regulation by starvation and Ras. *Cell* **68:** 1077–1090.

Gross, J.D., Bradbury, J., Kay, R.R., and Peacey, M.J. (1983) Intracellular pH and the control of cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **303:** 244–245.

Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **30:** e23.

Jackson, C.L., and Hartwell, L.H. (1990) Courtship in *S. cerevisiae*: both cell types choose mating partners by responding to the strongest pheromone signal. *Cell* **63:** 1039–1051.

Juhas, M., Eberl, L., and Tummler, B. (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **7:** 459–471.

Kato, M., Hayakawa, Y., Hyodo, H., Ikoma, Y., and Yano, M. (2000) Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol* **41:** 440–447.

Keller, L., and Surette, M.G. (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **4:** 249–258.

Kruppa, M. (2009) Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* **52:** 1–10.

Liu, H., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144:** 967–978.

Lo, W.S., and Dranginis, A.M. (1998) The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9:** 161–171.

McCusker (2006) *Saccharomyces cerevisiae*: an emerging and model pathogenic fungus. In *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. Heitman, J., Filler, S.G., Edwards, J.E., Mitchell, A.P. (eds). Washington, DC, USA: ASM Press, pp. 245–259.

Madden, K., and Snyder, M. (1998) Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* **52:** 687–744.

Nickerson, K.W., Atkin, A.L., and Hornby, J.M. (2006) Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol* **72:** 3805–3813.

Palkova, Z., and Vachova, L. (2003) Ammonia signalling in yeast colony formation. *Int Rev Cytol* **225:** 229–272.

Palkova, Z., and Vachova, L. (2006) Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev* **30:** 806–824.

Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M., and Forstova, J. (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* **390:** 532–536.

Palkova, Z., Devaux, F., Ricicova, M., Minarikova, L., Le Crom, S., and Jacq, C. (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell* **13:** 3901–3914.

Radford, D.R., Challacombe, S.J., and Walter, J.D. (1994) A scanning electron-microscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. *J Med Microbiol* **40:** 416–423.

Reynolds, T.B., and Fink, G.R. (2001) Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291:** 878–881.

Roberts, R.L., and Fink, G.R. (1994) Elements of a single map kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate 2 developmental programs in the same cell-type – mating and invasive growth. *Genes Dev* **8:** 2974–2985.

Shimkets, L.J. (1990) Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **54:** 473–501.

Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12:** 317–324.

Vachova, L., Kucerova, H., Devaux, F., Ulehlova, M., and Palkova, Z. (2009) Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ Microbiol* **11:** 494–504.

Vopalenska, I., Hulkova, M., Janderova, B., and Palkova, Z. (2005) The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. *Res Microbiol* **156:** 921–931.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Density of plating influences polarity of cell growth and microcolony development.
Fig. S2. Effect of ammonia on morphology of ΣS^h cells growing in liquid GM medium.
Fig. S3. Effect of ammonia and other amines on development of young solitary microcolonies.
Fig. S4. Effect of ammonia, ammonium and pH on development of young solitary microcolonies.
Fig. S5. Impact of ammonium sulfate concentration on morphology of cells growing in liquid or on solid SLAD.
Video S1. Development of ΣS^h microcolonies.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

5.2. Obecné faktory přispívající k tvorbě strukturovaných kolonií

Vedle tvorby strukturovaných kolonií se složitou trojrozměrnou strukturou je charakteristickým rysem přírodních kmenů *S. cerevisiae*, podobně jako v případě mnoha druhů patogenních kvasinek (JAIN et al., 2008), značná fenotypová variabilita. Ta se projevuje schopností tvořit několik morfologicky odlišných typů kolonií, od kolonií „vráskčitých" („fluffy") přes různé typy kolonií „částečně vráskčitých" („semi-fluffy") až po kolonie „hladké" („smooth"). Byť již primární izoláty obsahují buňky schopné produkce všech popsaných fenotypů, lze méně strukturované a hladké morfotypy, podobně jako je tomu v případě domestikace kmene BR-F (viz kap 3.4.) (KUTHAN et al., 2003), reprodukovatelně s relativně vysokou frekvencí získat z „vráskčité" varianty při kultivaci v laboratorních podmínkách.

Obecné faktory, které jsou důležité pro vznik a vývoj strukturovaných kolonií, nejsou zcela objasněny a jejich komplexní definice na širším genetickém pozadí spíše chybí. V tomto kontextu se jeví výše popsaná fenotypová variabilita nepříbuzných přírodních kmenů jako ideální prostor pro charakterizaci fyziologických a genetických rysů zodpovědných za vznik chování typického pro život v přírodních podmínkách. Produkce extracelulární matrix je jednou z vlastností typických pro strukturované kolonie. S přítomností ECM rovněž pravděpodobně souvisí další fyziologické charakteristiky kolonií, jako je jejich velikost či obsah vody. Všechny výše zmíněné vlastnosti přímo korelují se strukturovaností („vráskčitostí") kolonií, kdy největší množství ECM, nejvyšší obsah vody a nejvýraznější velikost vykazují kolonie „vráskčité". Intenzita těchto charakteristik je nižší u méně strukturovaných kolonií a nejnižší obsah vody, velikost a nedetekovatelné množství ECM je typické pro skupinu kolonií „hladkých". Podobný trend je možné pozorovat i v případě exprese některých genů např. *AQY1* a *FLO11*. Delece genu *FLO11* navíc způsobuje, podobně jako u kmene Σ1278, ztrátu schopnosti tvorby strukturovaných kolonií u všech testovaných přírodních kmenů. Klíčovou roli povrchové adhezivní molekuly Flo11p jsme zároveň prokázali zavedením regulovatelného promotoru před funkční alelu genu *FLO11*. Kolonie takového kmene je za neindukčních podmínek hladká, přidání induktoru a tedy obnovení exprese genu *FLO11* vede k obnovení tvorby strukturované kolonie. Mezi charakteristiky, které přímo nesouvisí s tvorbou komplexních kolonií, patří poměrně překvapivě morfologie a typ pučení buněk, ze kterých jsou kolonie složeny. Tvar, vláknitý růst a charakter pučení buněk v populaci kolonií jsou vlastnosti odlišné mezi jednotlivými kmeny, kdy „vráskčité"

kolonie některých kmenů jsou složeny s poměrně významného počtu pseudohyfálních, polárně pučících buněk, zatímco morfologicky velmi podobné kolonie kmene jiného jsou složeny pouze z klasických kulatých či oválných buněk.

Výsledky práce jsou prezentovány v následující publikaci:

(ŠŤOVÍČEK et al., 2010)

Šťovíček V., Váchová L., Kuthan M., Palková Z. (2010): **General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies**. *Fungal Genetics and Biology* **47**:1012-22. IF_{2010}=3,333

Fungal Genetics and Biology 47 (2010) 1012–1022

Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Genetics and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yfgbi

General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies

Vratislav Šťovíček [a], Libuše Váchová [a,b], Martin Kuthan [a], Zdena Palková [a,*]

[a] Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic
[b] Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 April 2010
Accepted 11 August 2010
Available online 20 August 2010

Keywords:
Colony morphology
Extracellular matrix
Flo11p adhesin
Wild yeast strains

ABSTRACT

The lifestyle of wild and laboratory yeast strains significantly differs. In contrast to the smooth colonies of laboratory strains, wild *Saccharomyces cerevisiae* strains form biofilm-like, strikingly structured colonies possessing distinctive traits enabling them to better survive in hostile environments in the wild. Here, comparing three sets of strains forming differently structured colonies (fluffy, semi-fluffy and smooth), each derived from ancestors with distinct genetic backgrounds isolated from natural settings (BR-88, BR-99 and BR-103), we specified the factors essential for the formation of structured colonies, i.e. for the lifestyle most likely to be preferred in the wild. The ability to form an abundant extracellular matrix (ECM) is one of the features typical for structured colonies. ECM influences colony architecture and many other physiological properties, such as the capability to retain water in a 2-fold surplus to wet cell biomass. ECM composition, however, differs among distinct strains, depending on their particular genetic background. We further show that the expression of certain genes (*AQY1*, *FLO11*) is also strictly related to the particular colony morphology, being highest in the most structured colonies. Flo11p adhesin, important for cell–cell and cell-surface adhesion, is essential for the formation of fluffy colonies and thus significantly contributes to the phenotype variability of wild yeast strains. On the other hand, surprisingly, neither the cell shape nor budding pattern nor the ability to form pseudohyphae directly influences the formation of three-dimensional fluffy colony architecture.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Microorganisms under natural conditions usually organize within multicellular communities exhibiting specific features which do not emerge under laboratory conditions (Palkova and Vachova, 2006). Examples are complicated biofilms, which settle different natural surfaces, e.g. in rivers and lakes. They also cause serious problems in medical care and technology because of their adhesion to various materials and high resistance to chemical treatments. Colonies growing on wet solid surfaces are another example of multicellular structures which are common in the wild. Microbial strains isolated from various natural environments (e.g. vineyards, water habitats, host body) form populations markedly differing from the populations of typical laboratory strains (Aguilar et al., 2007; Branda et al., 2001; Cavalieri et al., 2000; Franzot et al., 1998; Kuthan et al., 2003; Liu et al., 1996). Prolonged cultivation of social microorganisms in unstructured habitats such as non-changing batch conditions may lead to a loss of their social behavior (Velicer et al., 1998).

Various types of bizarre structured colonies as well as the phenomenon of their phenotypic switching were described many years ago during studies of clinical isolates of pathogenic yeasts of *Candida* sp. and *Cryptococcus neoformans* (Goldman et al., 1998; Slutsky et al., 1985). Phenotypic switching is a reversible occurrence of the spontaneous emergence of colonies with different morphological and physiological characteristics, with a frequency higher than mutations usually occur. Phenotypic switching thus provides population variability and contributes to rapid adaptation to a changing harmful environment (Jain et al., 2008). In the case of pathogenic yeasts, each phenotype displays a different level of virulence (Soll, 1992). *Candida albicans* is considered to be a dimorphic yeast (nowadays called polymorphic), capable of transitioning between different cellular forms (round budding form, pseudohyphae or true hyphae) depending on the environmental conditions (Sudbery et al., 2004). Scanning electron microscopy revealed the relationship between colony shape and the morphology of the constituent cells. While smooth colonies were entirely composed of rounded cells, the morphology of structured colonies was determined by the specific proportion of all cellular forms organized to variable layers. The surface waving of wrinkled colonies was suggested to be an effect of developing hyphae (Joshi and Gavin, 1975; Pesti et al., 1999; Radford et al., 1994).

The development of *Saccharomyces cerevisiae* populations living for a long time under laboratory conditions significantly differs from that of populations growing in the wild. This is particularly evident in the organization of colony architecture, which exhibits

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; HMWGP, high molecular weight glycoprotein; 3-D, three-dimensional.

* Corresponding author. Fax: +420 221951724.
E-mail address: zdenap@natur.cuni.cz (Z. Palková).

1087-1845/$ - see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.fgb.2010.08.005

a biofilm-like aerial morphology when formed by a *S. cerevisiae* strain freshly isolated from natural settings, while it becomes smooth when the same strain grows for some time on rich agar media. This process of domestication is connected with extensive changes in cell physiology, as indicated by changes in gene expression and other cellular characteristics (Kuthan et al., 2003). A wild yeast colonial population consequently acquires various features typical for the population of a laboratory strain. The domestication switch is a stable process, as the progenies of domesticated clones form typical smooth colonies during subsequent generations.

Despite all the described differences between natural colonial populations on one side and domesticated or laboratory strain populations on other side, the general traits essential for the formation of a biofilm-like colony architecture remain somewhat unknown. In this study, we analyzed three unrelated wild *S. cerevisiae* strains exhibiting significant phenotypic variability consisting of the formation of differently structured colony variants. We examined the morphology and physiology of the cells of these variants as well as the principles involved in the organization of their colonies. This allowed us to identify the general traits essential for the formation of the aerial three-dimensional (3-D) architecture of *S. cerevisiae* colonies.

2. Material and methods

2.1. Strains and media

The wild *S. cerevisiae* strains BR-88 (CCY 21-4-88), BR-99 (CCY 21-4-99) and BR-103 (CCY 21-4-103) were from the collection of the Chemical Institute of the Academy of Science, Bratislava, Slovak Republic. Colonies were grown on GMA (3% glycerol, 1% yeast extract, 2% agar). For selective plates, the medium was supplemented with 200 mg/l G418 (Duchefa Biochemie, The Netherlands) or 100 mg/l nourseothricin (Werner Bioagents, Germany).

2.2. Determination of colony biomass and number of cells forming the colony

The average diameter of a colony, biomass and number of cells within a colony were determined for colonies 3–5 or 7–14 days old plated at a density of 100–120 or 40–50 colonies per Petri dish, respectively. Such a colony density avoids colony size fluctuations caused by colony–colony inhibition, which occurs in high-density plating. The total number of cells forming one colony was determined using a haemocytometer. The biomass of colonies was estimated as their wet weight. To determine dry biomass, the wet biomass was dried on a Speed-vac for at least 6 h. Water content was calculated as the difference between wet and dry biomass. Data is the average of three independent experiments (two repetitions in each) ± SD (standard deviation).

2.3. Analysis of budding pattern

Cells from colonies were stained with 2 μM Calcofluor White M2R (Molecular Probes). Approximately 400 cells from the colonies were counted and scored for their percentage budding pattern under a Leica DMR fluorescent microscope (UV filter, excitation 340–380 nm). Data is the average of three independent experiments.

2.4. Staining of colony "footprint"

Colonial cells were washed off the agar. The remaining cells were stained with a solution of 0.1% Coomassie blue R250 in 40% methanol and 10% acetic acid for 1 h. After washing the plate with water and 40% methanol, 10% acetic acid, the stained cells were photographed in transmitted light.

2.5. Construction of the strains

Flo11p-GFP strains containing the *FLO11* gene fused with the *GFP* gene in their genome were constructed via previously described procedure (Gauss et al., 2005; Vopalenska et al., 2010), which enables the introduction of the *GFP* gene behind the *FLO11* signal sequence so that both the secretion sequence and C-terminus (important for GPI-anchor tagging) are preserved. Gene deletions and artificial promoter (P_{CUP1}) insertions were performed by transforming the cells with DNA cassettes generated by PCR using the primers and plasmids listed in Suppl. Tables 1a and 1b according to the procedures described in (Gueldener et al., 2002; Janke et al., 2004). Yeast cells were transformed according to (Gietz and Woods, 2002).

2.6. Photography and determination of the cell volume

Colonies were photographed in incident light. A Hitachi HV-C20 color camera was used with a Navitar objective, Fiber-Lite PL-800 or Kaiser Prolite illumination systems and NIS Elements software (Laboratory Imaging). One-day-old colonies (10× objective) and cells (100× immersion objective and Nomarski differential contrast) were photographed in transmitted light using a Leica DMR microscope and Cohu CCD camera. Cell micrographs were calibrated and cell parameters evaluated using NIS Elements. The volume of individual cells was estimated according to their particular shape. At least 300 cells were evaluated per sample.

2.7. ESEM analysis

The procedure for preparing samples of yeast colonies for observation under the AquaSEM (Tescan) environmental scanning electron microscope (ESEM) was described earlier (Kuthan et al., 2003). A matrix-preserving protocol was used to improve the visualization of ECM. Samples were observed under 500 Pa at −18 °C using an ionization detector at 15 kV.

2.8. Extracellular material extraction, SDS–PAGE and detection of protein glycosylation

The biomass of whole colonies was collected, mixed thoroughly and centrifuged (15 min, 4 °C, 18,000*g*) to remove cells. The extracellular aqueous phase was treated with acetone for 2 h (four volumes of acetone per one sample volume) at −20 °C. The precipitate containing the proteins was suspended in a denaturing sample buffer (1 μl of the sample buffer per extract from a biomass corresponding to 2 mg of dry biomass), denatured for 15 min at room temperature and separated on 9% SDS–PAGE. Gels were stained with silver (Rabilloud, 1990). Alternatively, the SDS–PAGE separated proteins were transferred to a PVDF membrane and the glycoproteins were visualized by sequential incubation in concanavalin A, horseradish peroxidase and chloronaphthol–H_2O_2 solution as described previously (Hawkes, 1982).

2.9. Northern blot analysis

Biomass from colonies (200 mg for fluffy and 100 mg for smooth colonies) was suspended in 400 μl TES (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) buffer. Total RNA was isolated by the hot phenol method (Cap et al., 2009). Twelve microgram of denatured total RNA in water–formamide (3:10) was separated on 1.5% agarose gel, transferred to a positively charged nitrocellulose membrane (Hybond N^+, Amersham Biosciences) and hybridized with specific probe. The probes used were complete ORFs of particular genes prepared by PCR reaction. For the *FLO11* probe, a PCR fragment corresponding to the last 1382 bp of the *FLO11* gene was used. The [α-^{32}P]dCTP labeled probes were obtained by ran-

dom priming using the DECAprime II Kit (Ambion). The Northern blots were densitometrically quantified using UltraQuant 6.0 software. The values presented are relative densities calculated for the maximal value of each film (set as 100%).

3. Results and discussion

In this study we used a set of 10 strains (Fig. 1 and Table 1) forming colonies with differently structured morphology, arising by phenotypic switching similar to that described previously for clinical isolates of *C. albicans* (Slutsky et al., 1985; Vargas et al., 2004). These strains were obtained as individual subclones of the three original *S. cerevisiae* natural isolates BR-88, BR-99 and BR-103 (isolated from different habitats such as a river, lake or mushrooms) plated on solid medium with a non-fermentable carbon source (GMA) (Suppl. Fig. 1). The strains were categorized into three groups according to their morphology. The first "fluffy" group includes the BR-99-F, BR-88-F and BR-103-F strains, the colonies of which exhibited highly structured biofilm-like fluffy morphology from early in their growth (3rd day). The second, "semi-fluffy" group includes strains forming less structured colonies than the fluffy group and/or those only developing the structured morphology later during their development. These are the BR-99-SF and BR-88-R colonies, which became fluffy on the 4th day and colonies of BR-103-SF and BR-88-WE strains, which remained less structured throughout their development. The third, "smooth" group includes the domesticated derivatives BR-99-S, BR-88-S and BR-103-S, forming colonies which were smooth over the whole of their development, thus resembling the colonies of laboratory strains. All isolated strains were stable and formed colonies with typical morphology under standard conditions.

3.1. Physiological properties of colonies are strictly related to their morphology

To characterize the basic physiological features of the colonies of the three groups (fluffy, semi-fluffy and smooth) during their development, we determined the average colony diameter, average cell number within a colony, wet and dry colony biomass and thus indirectly the water content (Fig. 2). The fluffy colonies were on average slightly but significantly larger in their diameter than their smooth counterparts (Fig. 2A). This difference was much more pronounced for the total wet colony biomass, usually 3-fold higher in fluffy colonies (Fig. 2B). This indicates that fluffy colonies are taller and more voluminous structures than relatively flat smooth colonies. On the other hand, smooth colonies were composed of a larger number of cells, counted per colony (Fig. 2C) or per biomass unit (data not shown). All this suggests that a fluffy colony is either composed of cells at least three times larger than in a smooth colony, or it contains a high percentage of extracellular fluid, to create the differences described above. As shown in Fig. 2D, there is no significant difference in the volume of cells harvested from fluffy and smooth colonies. On the other hand, fluffy colonies contain more water (Fig. 2B), which can be deposited in the intercellular space and within their extracellular matrix (ECM) possibly functioning as an extracellular water reservoir. Both suggest that extracellular fluid deposited in the intercellular space represents the key contribution to the large volume of a fluffy colony. As for semi-fluffy colonies, they fit in-between smooth and fluffy colonies in all measured characteristics (Fig. 2).

3.2. Differently structured colonies differ in their production of extracellular matrix

ECM containing a glycoprotein of MW >200 kDa was found in fluffy colonies formed by the *S. cerevisiae* BR-F strain (Kuthan et al., 2003). Therefore, we analyzed the colonies of all natural strains for the presence of ECM by environmental scanning electron microscopy (Fig. 3A). From day 6, abundant ECM was detected in the fluffy colonies of all three strains, while there was no such material present in any of the smooth colonies. A minor amount of ECM was also detected in semi-fluffy colonies.

We then asked the question of whether the high molecular weight glycoprotein (HMWGP) (Kuthan et al., 2003) is essential for the formation of a fluffy colony architecture in general. We prepared extracts of colony ECM and analyzed the proteins therein by electrophoresis. Despite all fluffy colonies contained abundant ECM, only BR-88-F fluffy colonies excreted glycoprotein (rust-colored by silver staining; Fig. 3A, blue arrow) with gel mobility similar to that of the HMWGP described previously. Presence of sugar moiety linked with this HMWGP was proved by ConA/peroxidase staining (Fig. 3B). A smaller amount of this protein was also visible in the ECM from colonies of one of the two semi-fluffy BR-88 derived strains (BR-88-R) (Fig. 3A). Interestingly, this strain formed colonies that in later developmental phases had morphology comparable to that of BR-88-F (Fig. 1). In contrast, such a glycoprotein was neither detected in the colonies of other fluffy and semi-fluffy strains nor in the colonies of any smooth strain.

This data suggests that the presence of an ECM is one of the features important for the formation of *S. cerevisiae* fluffy colony morphology. Smoothness is always connected with the absence of ECM. In the case of *C. neoformans*, wrinkled colony morphology was ascribed to a disordered packing of cells caused by a profuse amount of exopolysaccharide, in contrast to the more ordered and tight organization of smooth colonies (Fries et al., 1999). The ECM composition can however differ in different *S. cerevisiae* strains. For example, as in the case of bacterial glycocalyx (Costerton et al., 1981), in some our *S. cerevisiae* fluffy strains, the carbohydrate component could prevail over the protein component in such a way that the amount of an HMWGP protein could be below the detection limit. In addition, in some of the strains HMWGP protein could be covalently bound to the cell surface (e.g. to the cell wall), which could complicate its release to the extracellular liquid. It also cannot be excluded that other yet unknown proteins of substantially different MW could participate in the formation of the ECM. The finding that extracellular extracts of fluffy colonies generally contain larger amounts and a wider spectrum of different proteins than their smooth counterparts (Fig. 3A) supports this possibility.

Polysaccharides often form the major component of the extracellular material produced by microorganisms. It was shown, for example, that they can comprise up to approximately 80% of the extracellular polymeric material produced by *C. albicans* (McCourtie and Douglas, 1985). Polysaccharides possess a high water binding capacity as was shown for the extracellular mannans of *Rhodotorula acheniorum*, which were able to retain such an amount of water to multiply its own mass by a factor of 3.5 (Pavlova et al., 2005). ECM thus can considerably contribute to the retention of extracellular fluid in fluffy *S. cerevisiae* colonies. As a result, the proportion of dry mass in whole fluffy (and semi-fluffy) colony biomass is lowered (Fig. 2E) compared to smooth colonies, while the proportion of wet biomass is increased (Fig. 2B). Accordingly, the structured colonies of the BR-88 strain (BR-88-F, BR-88-R), containing the highest amount of ECM (Fig. 3), on average retain slightly more water than the structured colonies of other wild strains (not shown).

3.3. Distinct colony morphology develops independently of cell morphology and the polarity of cellular budding

Despite striking differences in colony morphology, the analysis of cells from *S. cerevisiae* colonies did not reveal any clear link between colony morphology, cell morphology and budding pattern (Fig. 4).

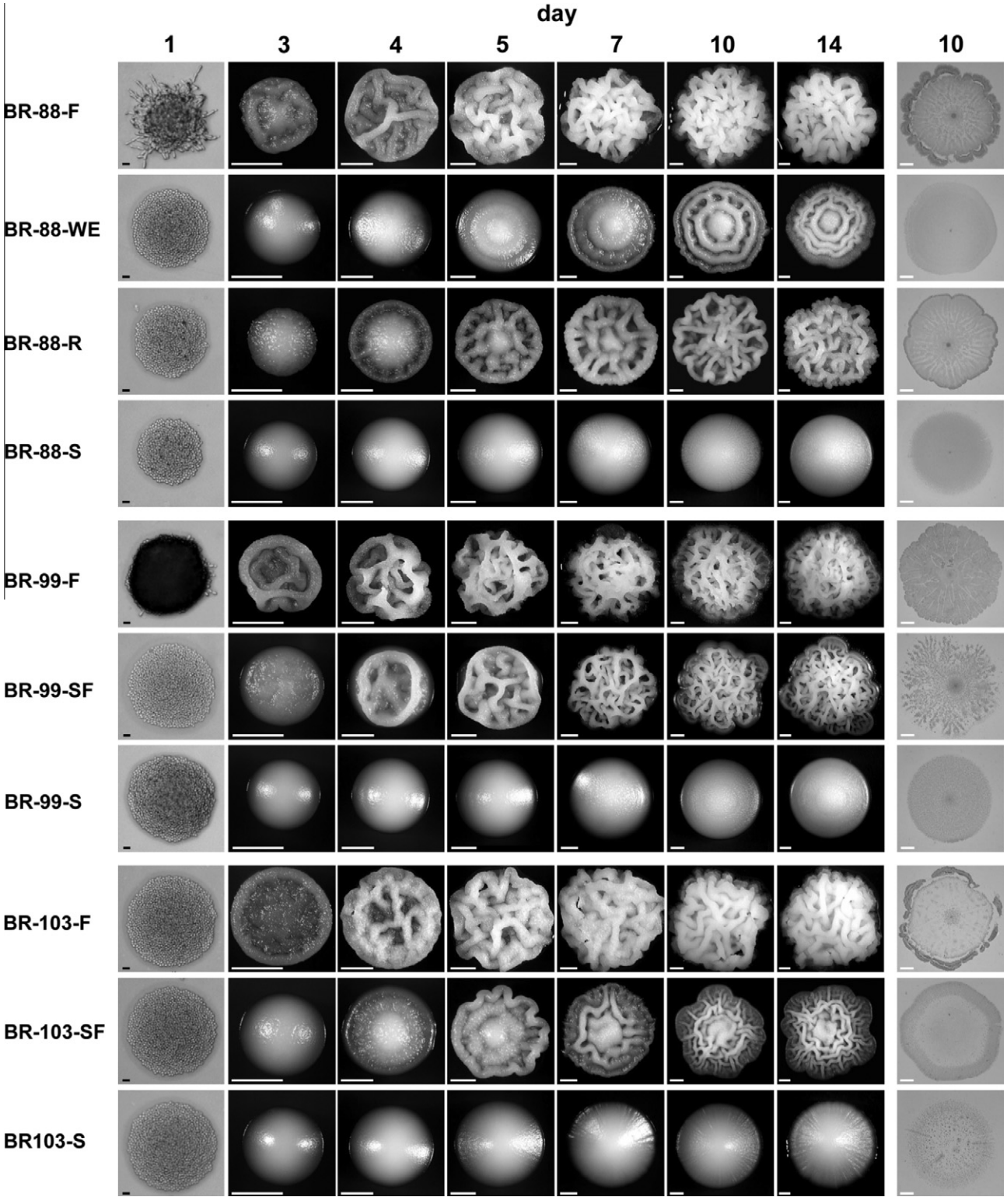


Fig. 1. Colony morphology of "fluffy", "semi-fluffy" and "smooth" strains derived from natural *S. cerevisiae* ancestors BR-88, BR-99 and BR-103. Rightmost column, footprints of attached cells after washing out the colony. White bar, 1 mm; black bar, 10 μm.

The colonies of all three groups (fluffy, semi-fluffy and smooth) were mostly composed of cells exhibiting bipolar budding (55–90%), which is typical for diploid cells (Chant and Pringle, 1995); fraction of cells budded randomly (Fig. 4A). The ratio of bipolarly and randomly budding cells did not significantly change during colony development (data not shown) and was more dependent on the strain genetic background than on its particular colony morphotype. In addition, exclusively in the fluffy colonies of BR-99-F and BR-88-F strains, we found a fraction (20%, approximately) of elongated unipolarly budding cells, which formed short pseudohyphae in some cases. Fluffy colonies can be therefore composed of either elongated cells and pseudohyphae (strains BR-99-F, BR-88-F) or rounded/oval cells (strain BR-103-F) (Fig. 4C), similar to those usually present in semi-fluffy and smooth colonies (Fig. 4B). This data clearly shows

Table 1
Strains used in this study.

Strain	Colony morphology category*	Genetic background
BR-88-F	Fluffy	BR-88, *MATa*/*MATα*
BR-88-F-Flo11p-GFP	Fluffy	BR-88, *MATa*/*MATα*, *FLO11*-GFP/*FLO11*
BR-88-F-*flo11*	Smooth	BR-88, *MATa*/*MATα*, *flo11Δ::kanMX*/*flo11Δ::nat1*
BR-88-R	Semi-fluffy	BR-88, *MATa*/*MATα*
BR-88-WE	Semi-fluffy	BR-88, *MATa*/*MATα*
BR-88-S	Smooth	BR-88, *MATa*/*MATα*
BR-99-F	Fluffy	BR-99, *MATa*/*MATα*
BR-99-F-Flo11p-GFP	Fluffy	BR-99, *MATa*/*MATα*, *FLO11*-GFP/*FLO11*
BR-99-F-*flo11*	Smooth	BR-99, *MATa*/*MATα*, *flo11Δ::kanMX*/*flo11Δ::nat1*
BR-99-F-P_{CUP1}-*FLO11*	Smooth	BR-99, *MATa*/*MATα*, P_{CUP1}-*FLO11*/*flo11Δ::kanMX*
BR-99-F-*aqy1*	Fluffy	BR-99, *MATa*/*MATα*, *aqy1Δ::kanMX*/*aqy1Δ::nat1*
BR-99-SF	Semi-fluffy	BR-99, *MATa*/*MATα*
BR-99-S	Smooth	BR-99, *MATa*/*MATα*
BR-103-F	Fluffy	BR-103, *MATa*/*MATα*
BR-103-F-Flo11p-GFP	Fluffy	BR-103, *MATa*/*MATα*, *FLO11*-GFP/*FLO11*
BR-103-F-*flo11*	Smooth	BR-103, *MATa*/*MATα*, *flo11Δ::kanMX*/*flo11Δ::nat1*
BR-103-SF	Semi-fluffy	BR-103, *MATa*/*MATα*
BR-103-S	Smooth	BR-103, *MATa*/*MATα*
BR-F	Fluffy	*MATa*/*MATα*

* For colonies grown on standard GMA medium.

that the polarity of budding and shape of *S. cerevisiae* cells are not essential prerequisites for the formation of distinct colony morphology. This finding is in direct contrast to previous studies of some non-conventional yeasts, where a clear link between colony and cell morphology was described (see also Section 1) (Radford et al., 1994; Wartmann et al., 2000).

Most *S. cerevisiae* laboratory strains form colonies that are not attached to the agar surface and thus their cells can be completely washed out from the agar (data not shown). In contrast, the colonies of all tested strains, whether fluffy or smooth, left footprints of remnant cells when washed out from the agar (Fig. 1). In general, more structured colonies appeared to be more attached to the agar than smooth or semi-fluffy colonies, however the exact pattern was specific to the particular strain and probably reflects the internal organization of the colony and the sites of its attachment to the agar surface.

3.4. Specific gene expression in fluffy and smooth colonies

A genome-wide comparison of transcriptomes isolated from fluffy BR-F and smooth BR-S colonies (Kuthan et al., 2003) showed relatively extensive gene expression differences. We therefore asked the question of which of the most prominent expression differences described for BR-F and BR-S, could be directly and generally related to specific colony morphology, and which genes could thus play a role in determining morphology. We analyzed the expression profiles of selected genes in the colonies of all studied strains during 14 days of their development. We chose the genes *FLO11* (for Flo11p surface cell adhesin), *TIP1* (for serine–alanine-rich cell wall mannoprotein), *AQY1* (for water channel aquaporin), *MAL31* (for high-affinity maltose permease), *MAL32* (for maltase involved in maltose catabolism) and *INO1* (for inositol 1-phosphate synthase) as prominent representatives of the group of genes which were expressed at higher levels in fluffy BR-F colonies compared to domesticated BR-S colonies, and the *SPS100* (encoding spore wall associated protein) and *CTS1* (encoding endochitinase) genes as members of the gene group which was less expressed in BR-F than in BR-S colonies (Kuthan et al., 2003).

The expression of most of the analyzed genes (*TIP1*, *INO1*, *MAL31*, *MAL32*, *SPS100* and *CTS1*) was not specific for any particular colony morphotype (Suppl. Figs. 3 and 4). This can be demonstrated with the following examples: The expression of *CTS1* gene was changed similarly to BR-F versus BR-S colonies (Kuthan et al., 2003), but only in the colonies of BR-103 derived strains; i.e. a high expression in the smooth and low expression in the fluffy BR-103 morphotype was observed. There was, however, no difference in *CTS1* expression between the structured and non-structured colonies of BR-88 and BR-99 derived strains. Similarly, the expression of the *TIP1* gene followed the same pattern of highest expression in a fluffy morphotype observed in BR-F in strains derived from BR-88 and BR-99. On the other hand, *TIP1* expression was highest in the smooth colonies of BR-103-S strain (Suppl. Fig. 3). Genes of maltose metabolism (*MAL32*) and transport (*MAL31*) exhibit a similar high expression pattern in fluffy and semi-fluffy colonies of BR-88 and BR-103 strains, while their expression was lower in the smooth colonies (Suppl. Fig. 4). BR-99-derived strains, however, did not express these genes in any type of colonies, thus excluding the possibility that maltose metabolism is essentially involved in the formation of all structured colonies. This data clearly shows that many differences in gene expression which were previously detected are specific for the particular genetic background of an isogenic set of fluffy and smooth strains, and thus are not directly involved in the changes connected with the formation of distinct colony morphology.

Only two of the studied genes, *FLO11* and *AQY1*, have an expression which was strictly dependent on colony morphology, independently of the genetic background (Fig. 5, Suppl. Fig. 2). The first, *FLO11* encoding the adhesin Flo11p, was highly expressed in the fluffy colonies of all three strains, while its expression was low in colonies of the smooth group strains and intermediate in colonies of semi-fluffy strains. During the first days of fluffy colony development, *FLO11* expression was at its highest, being more than five times higher than in the colonies of the smooth strains. *FLO11* expression gradually decreased during fluffy colony ageing, while in smooth colonies, it was maintained at the same, although low, value. Interestingly, in semi-fluffy colonies, the maximum of the *FLO11* expression (50–60% of the maximal value reached in fluffy colonies) was maintained until the 5th day of their development, which correlates with the initiation of their fluffy structure formation. Some relationship between structured colony morphology and elevated expression from the *FLO11* promoter was suggested for "flor" yeasts (Barrales et al., 2008) carrying the modified *FLO11F* allele (Fidalgo et al., 2006). The second gene, *AQY1* encoding aquaporin, was also highly expressed in fluffy colonies compared to their smooth counterparts (Fig. 5). Its expression was, however, not only low in smooth, but also in semi-fluffy colonies. In contrast to *FLO11*, the expression of *AQY1* in fluffy colonies was highest at about the 7th day, thus indicating that Aqy1p probably participates in later colony developmental periods than Flo11p. This prediction is supported also by the observation that formation of fluffy colony morphology is not affected by the deletion of *AQY1* gene (not shown).

3.5. Changes in Flo11p expression affect colony morphology

To evaluate effect of different level of Flo11p on colony and cell morphology, we constructed *flo11Δ* strains derived from BR-99-F, BR-88-F and BR-103-F, respectively. In addition, we constructed the BR-99-F-P_{CUP}-*FLO11* strain containing *FLO11* gene under the control of inducible *CUP1* promoter (Table 1). Deletion of *FLO11* gene caused loss of 3-D structured colony architecture and resulted in formation of flat smooth colonies composed of oval cells (Fig. 6A) exhibiting bipolar or random budding pattern (not

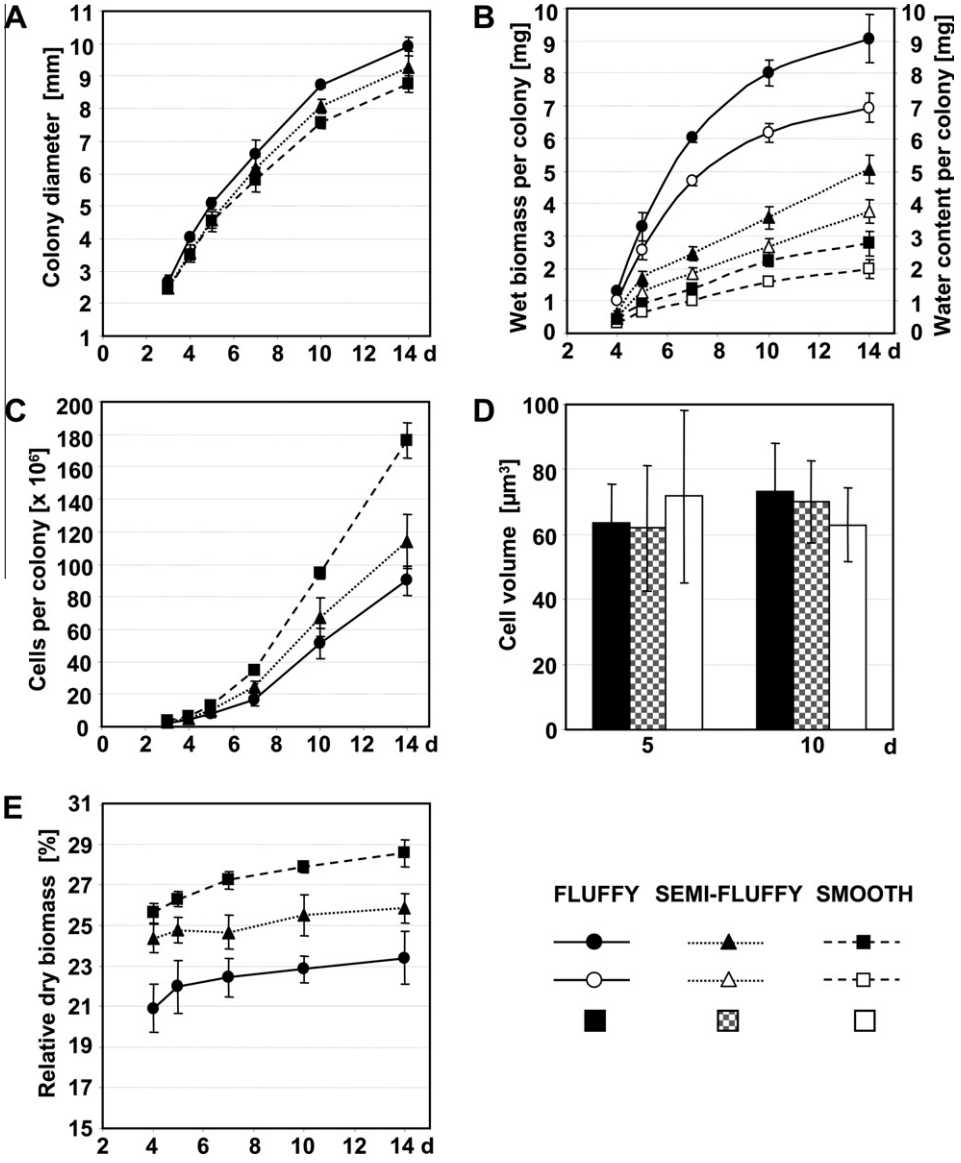


Fig. 2. Physiological properties of fluffy, semi-fluffy and smooth colonies. Changes in average colony diameter (A), wet biomass (full symbols) and water content (open symbols) (B), cell number (C), cell volume (D) and relative dry biomass (E) of particular morphotype during colony development. All parameters were estimated and calculated for the colonies of all strains. Averaged parameters of BR-99-F, BR-88-F and BR-103-F colonies represent characteristics of the fluffy morphotype; those of BR-103-SF, BR-99-SF, BR-88-WE and BR-88-R colonies the semi-fluffy morphotype and of BR-99-S, BR-88-S and BR-103-S colonies the smooth morphotype. Bars represent standard deviation of particular strain(s) from average value of particular morphotype. Volumes of cells from colonies of individual strains are shown in Suppl. Fig. 5.

shown). These colonies were indistinguishable from colonies belonging to the "smooth" group. BR-99-F-P_{CUP1}-*FLO11* strain also formed smooth colonies when growing on GMA plates, i.e. under the conditions where *FLO11* expression is absent. Induction of P_{CUP1} by the copper triggered formation of colonies with fluffy morphology (Fig. 6B). In addition, presence of the copper in GMA partially modifies fluffy morphology appearance of both BR-99-F and of BR-99-F-P_{CUP1}-*FLO11* colonies (Fig. 6B). It had, however, no impact on smooth morphology of *flo11*Δ mutants (not shown). These data strongly supported predicted function of Flo11p in formation of structured colony morphology.

3.6. Flo11p is present on the surface of cells from fluffy colonies independently of cell shape

The function of Flo11p protein was linked with yeast cell ability of invasive/pseudohyphal growth (Lo and Dranginis, 1998) and particularly with the effectiveness of cell–cell adhesion resulting in flocculation (Verstrepen and Klis, 2006) and cell-surface adhesion, a feature essential for the successful maturation of a *S. cerevisiae* biofilm (Reynolds and Fink, 2001). It was also proposed that *FLO11* expression is specific for pseudohyphae, while it is absent in the yeast cell form (Guo et al., 2000). Analysis of *FLO11* expression in the colonies of the particular morphotype formed by strains of different genetic background, showed a clear link between the *FLO11* mRNA level and colony fluffiness. The strains containing the highest level of *FLO11* mRNA formed the most structured colonies. Cell morphology analysis, however, revealed that BR-103-F colonies are mostly composed of rounded cells. This elicited the question of whether the Flo11p protein is produced in fluffy colonies independently of the type of cells (elongated pseudohyphae versus rounded cells). To examine this, we constructed strains derived from BR-99-F, BR-88-F and BR-103-F containing the *GFP* gene fused with the *FLO11* gene (Table 1). Newly constructed strains

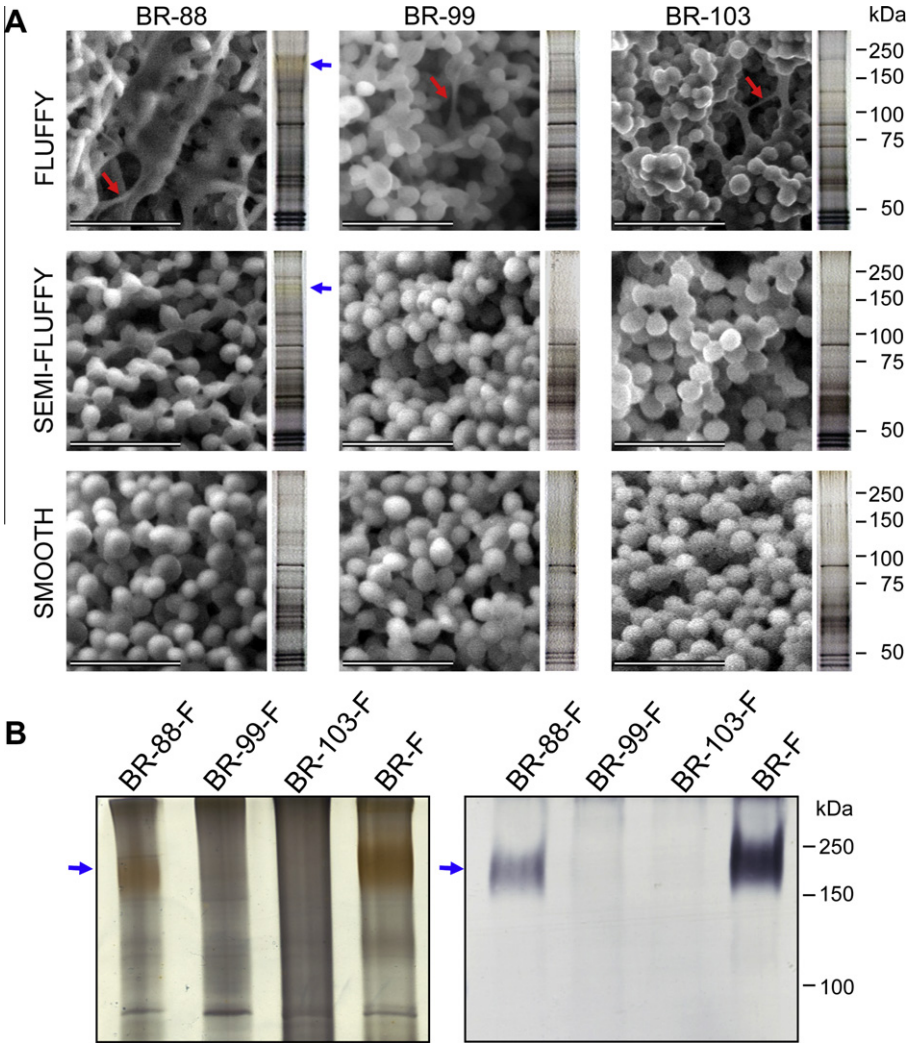


Fig. 3. Colony ultrastructure and ECM protein composition. (A) Surfaces of 10-day-old colonies observed from above by ESEM using matrix-preserving protocol are shown. Proteins extracted from the extracellular fluid are shown on the right. The typical pattern of two BR-88 semi-fluffy morphotypes (BR-88-WE, BR-88-R) is represented here by the BR-88-R strain. Scale bars, 20 μm. Red arrow, ligaments of ECM; blue arrow, glycoprotein of MW >200 kDa. (B) On the left, SDS–PAGE (7.5% gel) of fluffy strain protein extracts; extract from BR-F colonies is shown to compare position of HMWGP (blue arrow) (Kuthan et al., 2003). On the right, conA/peroxidase visualization of a sugar moiety linked to the glycoprotein.

formed colonies with a morphology comparable to that of colonies of the particular parental strain (not shown). As shown in the Fig. 6C, the fluffy colonies of all strains possess a high amount of Flo11p-GFP on the surface of the majority of cells harvested from the colony, independently of the particular cell morphology, i.e. not only the pseudohyphae or elongated cells of BR-88-F and BR-99-F colonies, but also the rounded and slightly oval cells of BR-103-F colonies produce Flo11p-GFP in high quantities in young colonies as well as in colonies with a fully developed aerial structure. This indicates that Flo11p role in shaping the 3-D architecture of fluffy colonies is not connected with its possible role in pseudohyphae formation, but more probably with function in cell adhesivity and the organization of cells within the structured colony. This proposal is supported by the finding that although colonies of all natural strains adhere to agar more effectively than the colonies of laboratory strains, this adherence is most intense in most structured fluffy colonies. Simultaneously, cell clumping is most prominent in the colonies of all fluffy strains, while it is weak in smooth colonies (not shown). In conclusion, our data shows that independently of its possible role in cell morphogenesis, Flo11p is significantly involved in the process of fluffy colony formation and thus contributes to phenotypic variability by which population plasticity can be achieved in strains living in a changing harmful environment.

4. Conclusions

Environmental conditions have an important impact on the properties of the multicellular communities that are formed by microorganisms. Besides the structured natural biofilms (Stoodley et al., 2002) formed by mobile bacteria as a pellicle at the surface of water ecosystems or attached to their bottom, this is particularly evident in the biofilm-like colonies of yeast and bacteria grown on wet surfaces (Ben-Jacob et al., 1998; Granek and Magwene, 2010). It was shown that *S. cerevisiae* laboratory strains usually form smooth colonies with no markedly structured morphology, whereas wild *S. cerevisiae* strains freshly isolated from natural settings form structured fluffy colonies, even in the laboratory (Kuthan et al., 2003). New results allowed us to distinguish two categories of features connected with the "fluffiness" and "smoothness" of *S. cerevisiae* colonies. The first category is comprised of

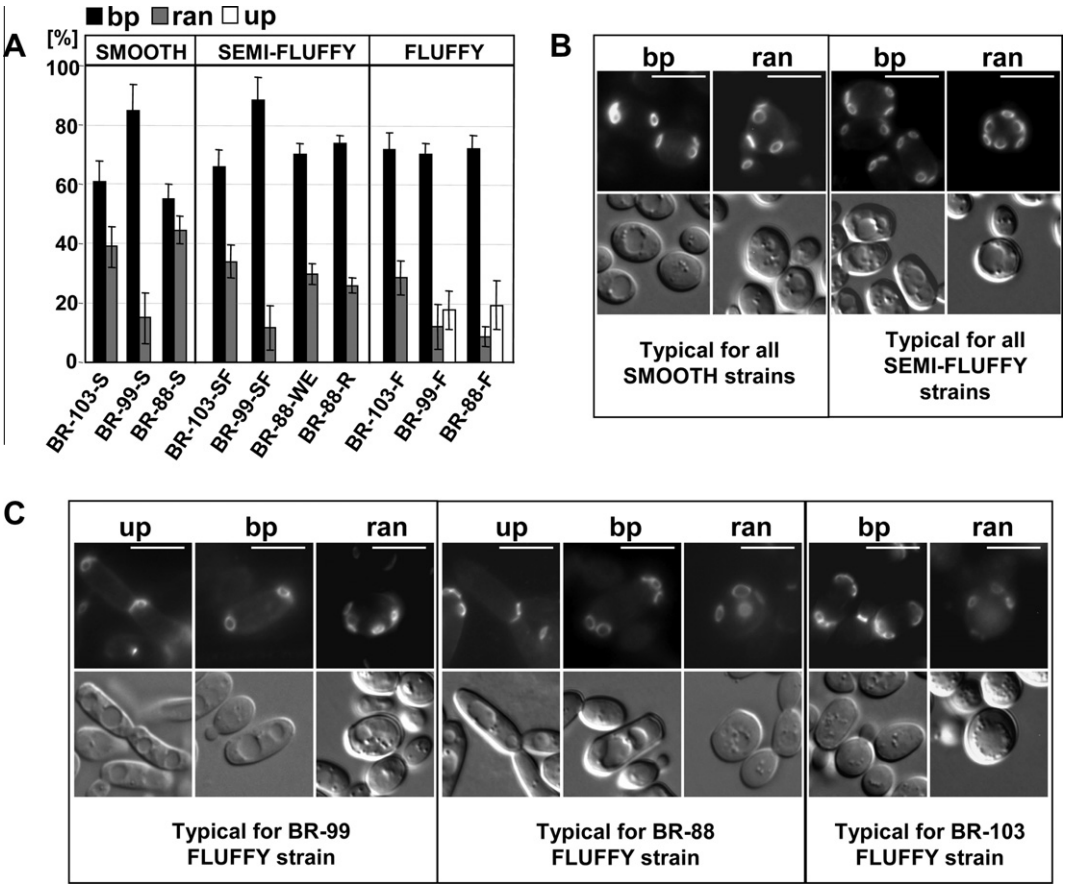


Fig. 4. Cell morphology and budding polarity. (A) Proportion of bipolar (bp), random (ran) and unipolar (un) cell budding. Cells containing 3–10 scars were calculated to avoid replicatively aged cells. (B) Cell morphology and examples of bipolar and random budding typical for smooth and semi-fluffy colony morphotype. (C) Cell morphology and cellular budding typical for fluffy colonies of BR-88-F, BR-99-F and BR-103-F. Bar, 5 μm.

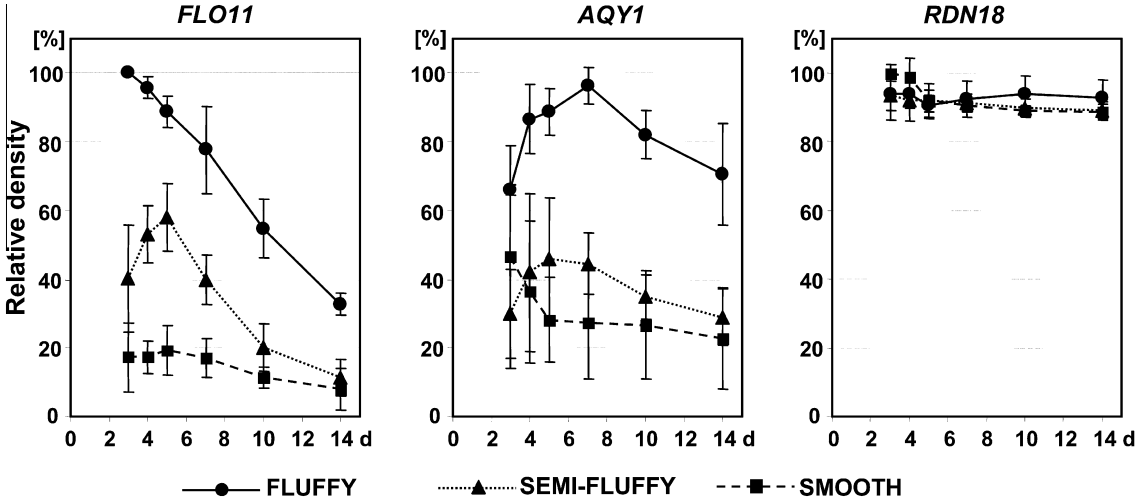


Fig. 5. Gene expression in fluffy, semi-fluffy and smooth colonies. Average changes in expression of *FLO11*, *AQY1* and control non-regulated gene *RDN18* during colony development are shown. The highest expression value for each genetic background (BR-88, BR-99 or BR-103) was set as 100%. Averaged values of BR-99-F, BR-88-F and BR-103-F colonies represent characteristics of the fluffy morphotype; those of BR-103-SF, BR-99-SF, BR-88-WE and BR-88-R colonies the semi-fluffy morphotype and of BR-99-S, BR-88-S and BR-103-S colonies the smooth morphotype. Bars represent standard deviation of particular strain(s) from average value of particular morphotype.

colony features which are strictly related to a particular colony morphology regardless of which strain (genetic background) is the original ancestor of the fluffy, semi-fluffy and smooth strains. These can be considered to be essential characteristics inevitable for the development of 3-D colony architecture of a particular morphotype. These features include *FLO11* and *AQY1* gene expression, which is high in all fluffy strains. The Flo11p surface glycoprotein when present in high levels could be involved in adhesion and cell–cell interaction and organization within the structure. The water channel aquaporin Aqy1p can influence water permeability

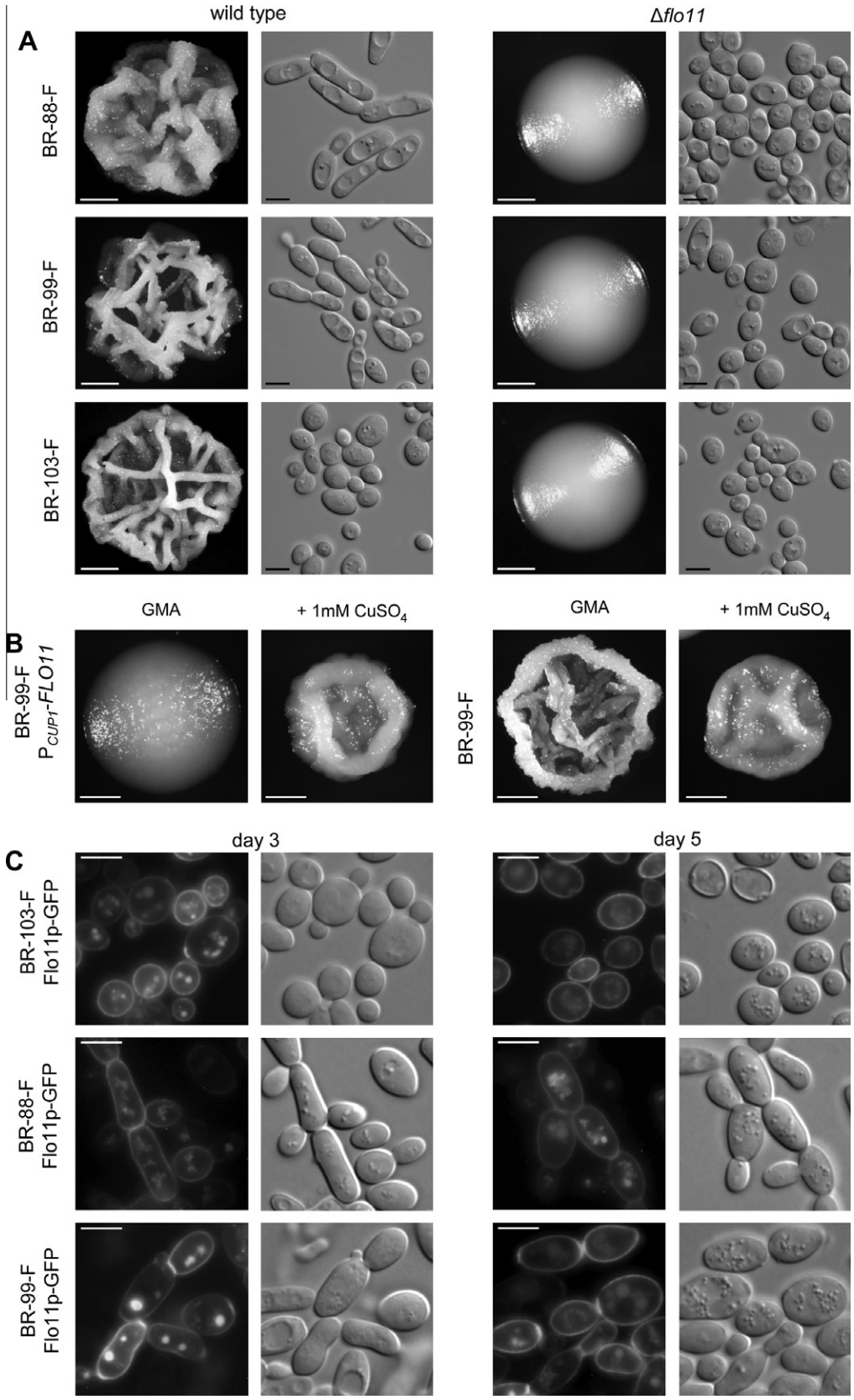


Fig. 6. Flo11p is protein important for the formation of fluffy colonies. (A) Morphology of colonies and cells formed by fluffy strains and their *flo11Δ* derivatives. White bar, 1 mm; black bar, 5 μm. (B) Morphology of colonies formed by BR-99-F-P_{CUP}-*FLO11* and BR-99-F strain grown either on GMA or on GMA containing Cu^{2+}. Bar, 1 mm. (C) Localization of Flo11p-GFP to the surface of cells forming fluffy colonies. Bar, 5 μm.

and the surface properties of cells within the colony. Certain effects of another *S. cerevisiae* aquaporin Aqy2p on the morphology of Σ1267 colonies were recently described (Furukawa et al., 2009). Interestingly, *FLO11* is not expressed in the majority of laboratory strains due to a mutation in the *FLO8* transcriptional activator (Liu et al., 1996) and *AQY1* seems to be mutated in smooth laboratory strains (Bonhivers et al., 1998). Furthermore, the *S. cerevisiae* Σ1278 strain, a wide-spread laboratory model of morphogenetic studies, is able to express the *FLO11* gene and contains a functional allele of the *AQY1* gene (Bonhivers et al., 1998). The cells of the Σ1278 strain and its haploid derivative are capable of forming fluffy colonies similar to those of wild *S. cerevisiae* isolates and Flo11p is important to the formation of their morphology (Vopalenska et al., 2010).

Another prominent property of all studied fluffy colonies is the production of a high amount of ECM. This means that as in biofilms, ECM also plays an important role in the formation of the fluffy colonies of natural yeast strains. ECM retains extracellular liquid, thus increasing the water content of fluffy colonies, which is another typical characteristic markedly related to the colony structure (Fig. 2). Due to this property, the matrix can protect a natural colony against desiccation and can help with feeding cells located far away from the nourishing agar. The exact composition of the proteins within this matrix, however, belongs to the second category of properties specific for strains derived from particular ancestor(s) i.e. those not determining fluffiness or smoothness in general. This applies to the HMWGP detected in the ECM of BR-F colonies (Kuthan et al., 2003), the analogous protein of which was only found in fluffy and semi-fluffy colonies derived from the BR-88 ancestor. The ECM of structured colonies derived from other two ancestors (BR-99 and BR-103) either contains HMWGP covalently bound to the cell surface or some other proteins of distinct MW are involved, or the ECM is composed mostly of polysaccharides. Besides differences in protein composition, the polysaccharide composition of ECM can also differ. This is indicated by the finding that maltose metabolism and transport may be involved in forming the fluffy colonies with BR-F (Kuthan et al., 2003), BR-88 and BR-103 ancestors, but not of those derived from the BR-99 ancestor.

Besides these two categories of features related to differences in colony morphology, a relatively large group of characteristics was mostly specific for strain genetic background independently of colony architecture. These characteristics surprisingly also include such features as cell morphology and budding pattern. There was no significant difference in the polarity of budding of cells from colonies of different morphotypes and colony morphology does not correlate with cell morphology. Fluffy colonies can be formed from either elongated cells or pseudohyphae (e.g. BR-99 or BR-88 derived strains) or rounded yeast cells (BR-103 derived strains). This data is in agreement with the previous observation that disruption of the *BUD1* gene does not significantly influence the morphology of the colonies of various *S. cerevisiae* laboratory strains (Vopalenska et al., 2005). Thus, budding and cell morphology are not the key factors influencing *S. cerevisiae* colony architecture directly, and the formation of pseudohyphae is not essential for the organization of fluffy colonies.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Grant Agency of the Czech Republic 204/08/0718 and from the Ministry of Education LC531, Research Concepts MSM0021620858 and AV0Z50200510, GAUK 261214 and by the Howard Hughes Medical Institute International Research Award (#55005623 to Z.P.).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.fgb.2010.08.005.

References

Aguilar, C. et al., 2007. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. Curr. Opin. Microbiol. 10, 638–643.
Barrales, R.R. et al., 2008. Identification of novel activation mechanisms for *FLO11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 178, 145–156.
Ben-Jacob, E. et al., 1998. Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. Annu. Rev. Microbiol. 52, 779–806.
Bonhivers, M. et al., 1998. Aquaporins in *Saccharomyces* genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains. J. Biol. Chem. 273, 27565–27572.
Branda, S.S. et al., 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 11621–11626.
Cap, M. et al., 2009. Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. J. Biol. Chem. 284, 32572–32581.
Cavalieri, D. et al., 2000. Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 12369–12374.
Costerton, J.W. et al., 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol. 35, 299–324.
Fidalgo, M. et al., 2006. Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 11228–11233.
Franzot, S.P. et al., 1998. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. Infect. Immun. 66, 89–97.
Fries, B.C. et al., 1999. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. Infect. Immun. 67, 6076–6083.
Furukawa, K. et al., 2009. Expression of the yeast aquaporin Aqy2 affects cell surface properties under the control of osmoregulatory and morphogenic signalling pathways. Mol. Microbiol. 74, 1272–1286.
Gauss, R. et al., 2005. New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 22, 1–12.
Gietz, R.D., Woods, R.A., 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods Enzymol. 350, 87–96.
Goldman, D.L. et al., 1998. Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14967–14972.
Granek, J.A., Magwene, P.M., 2010. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. PLoS Genet. 6, e1000823.
Gueldener, U. et al., 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. Nucleic Acids Res. 30, e23.
Guo, B. et al., 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell–cell adhesion, and mating. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 12158–12163.
Hawkes, R., 1982. Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate–gel electrophoresis and protein blotting. Anal. Biochem. 123, 143–146.
Chant, J., Pringle, J.R., 1995. Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 129, 751–765.
Jain, N. et al., 2008. Phenotypic switching in fungi. Curr. Fungal Infect. Rep. 2, 180–188.
Janke, C. et al., 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. Yeast 21, 947–962.
Joshi, K.R., Gavin, J.B., 1975. The morphology of colony variants of three species of *Candida*. Sabouraudia 13, 274–279.
Kuthan, M. et al., 2003. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. Mol. Microbiol. 47, 745–754.
Liu, H. et al., 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. Genetics 144, 967–978.
Lo, W.S., Dranginis, A.M., 1998. The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell 9, 161–171.
McCourtie, J., Douglas, L.J., 1985. Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion. J. Gen. Microbiol. 131, 495–503.
Palkova, Z., Vachova, L., 2006. Life within a community: benefit to yeast long-term survival. FEMS Microbiol. Rev. 30, 806–824.
Pavlova, K. et al., 2005. Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC. World J. Microbiol. Biotechnol. 21, 279–283.
Pesti, M. et al., 1999. Scanning electron microscopy characterisation of colonies of *Candida albicans* morphological mutants. J. Med. Microbiol. 48, 167–172.
Rabilloud, T., 1990. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. Electrophoresis 11, 785–794.
Radford, D.R. et al., 1994. A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. J. Med. Microbiol. 40, 416–423.

Reynolds, T.B., Fink, G.R., 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. Science 291, 878–881.
Slutsky, B. et al., 1985. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. Science 230, 666–669.
Soll, D.R., 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. Clin. Microbiol. Rev. 5, 183–203.
Stoodley, P. et al., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. 56, 187–209.
Sudbery, P. et al., 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 12, 317–324.
Vargas, K. et al., 2004. *Candida albicans* switch phenotypes display differential levels of fitness. Med. Sci. Monit. 10, 198–206.
Velicer, G.J. et al., 1998. Loss of social behaviors by *Myxococcus xanthus* during evolution in an unstructured habitat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12376–12380.
Verstrepen, K.J., Klis, F.M., 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. Mol. Microbiol. 60, 5–15.
Vopalenska, I. et al., 2005. The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. Res. Microbiol. 156, 921–931.
Vopalenska, I. et al., 2010. Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. Environ. Microbiol. 12, 264–277.
Wartmann, T. et al., 2000. Morphology-related effects on gene expression and protein accumulation of the yeast *Arxula adeninivorans* LS3. Arch. Microbiol. 173, 253–261.

5.3. Vnitřní struktura kolonií a mechanismy podílející se na jejich ochraně

Tvorba strukturovaných kolonií a jim v mnoha ohledech podobných biofilmů je výhodná strategie pro život v nehostinných podmínkách vnějšího prostředí (PALKOVÁ & VÁCHOVÁ, 2006). Je známo, že biofilmy patogenních kvasinek jsou velmi rezistentní vůči antimykotickým látkám a imunitnímu systému hostitele (CHANDRA et al., 2005). Jaký je však mechanismus zodpovědný za takové vlastnosti? Je zřejmé, že odpověď na tuto otázku nebude jednoduchá a pravděpodobně leží v komplexní architektuře mnohobuněčných populací a koordinovaném působení mnoha faktorů, které se na její tvorbě podílejí (D'ENFERT, 2006). Naše výsledky ukazují, že právě strukturovaná kolonie přírodních kmenů kvasinek může být dobrým modelem pro studium takových dějů i vzhledem k nesnadné experimentální uchopitelnosti modelů studia patogenních biofilmů. Využití dvoufotonové konfokální mikroskopie nám totiž dovolilo nahlédnout hlouběji do struktury prostorově heterogenní kolonie, sledovat její vznik a diferenciaci jednotlivých buněčných populací a definovat jejich roli při ochraně a vývoji celého společenství.

K vývoji komplexní trojrozměrné architektury kolonií přírodních kmenů dochází během několika dnů růstu na pevném médiu z původně na první pohled nepříliš diferencovaného útvaru. Avšak již velmi brzy po zformování takové populace dochází uvnitř kolonie k funkční a prostorové diferenciaci jednotlivých buněčných subpopulací. Podlouhlé vláknité buňky se vyskytují zejména na bázi kolonie a později s vývojem kolonie vytváří masivní „kořenovitou“ strukturu upevňují celý útvar k substrátu. Od raných fází vývoje kolonie se vnější vrstva kolonie podílí na ochraně celého společenství proti nežádoucím toxickým látkám v okolí. Buňky v tomto místě totiž mají v membráně aktivní transportéry (Pdr5p a Snq2p z rodiny transportérů zodpovědných za tzv. pleitropní lékovou rezistenci), které jsou schopny tyto látky odstraňovat. Vnitřní oblast kolonie je zase chráněna selektivně propustnou extracelulární hmotou, která zabraňuje průchodu některých látek a poskytuje tak ochranu dělícím se buňkám uvnitř kolonie a umožňuje vznik nových buněčných generací. Vrstva buněk vybavených efluxními pumpami se postupem času zužuje, paralelně se ovšem rozšiřuje oblast vyplněná ECM. Pro komplexní ochranu společenství je tedy nezbytná rovněž časoprostorově koordinovaná a komplementární interakce výše zmíněných mechanismů. Stabilitu celého útvaru, jeho vertikální expanzi a vznik typického „vráscitého“ vzhledu, pravděpodobně zajišťují vláknité mezibuněčné spoje, kterými jsou buňky v celé kolonii propojeny a na jejichž tvorbě se podílí povrchový adhezivní protein Flo11p.

Výsledky práce jsou prezentovány v následujících dvou publikacích:

(VÁCHOVÁ et al., 2011)

Váchová L., Šťovíček V., Hlaváček O., Chernyavskiy O., Štěpánek L., Kubínová L., Palková Z. (2011): **Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies**. *Journal of Cell Biology* **194**:679-87. IF_{2010}=9,921

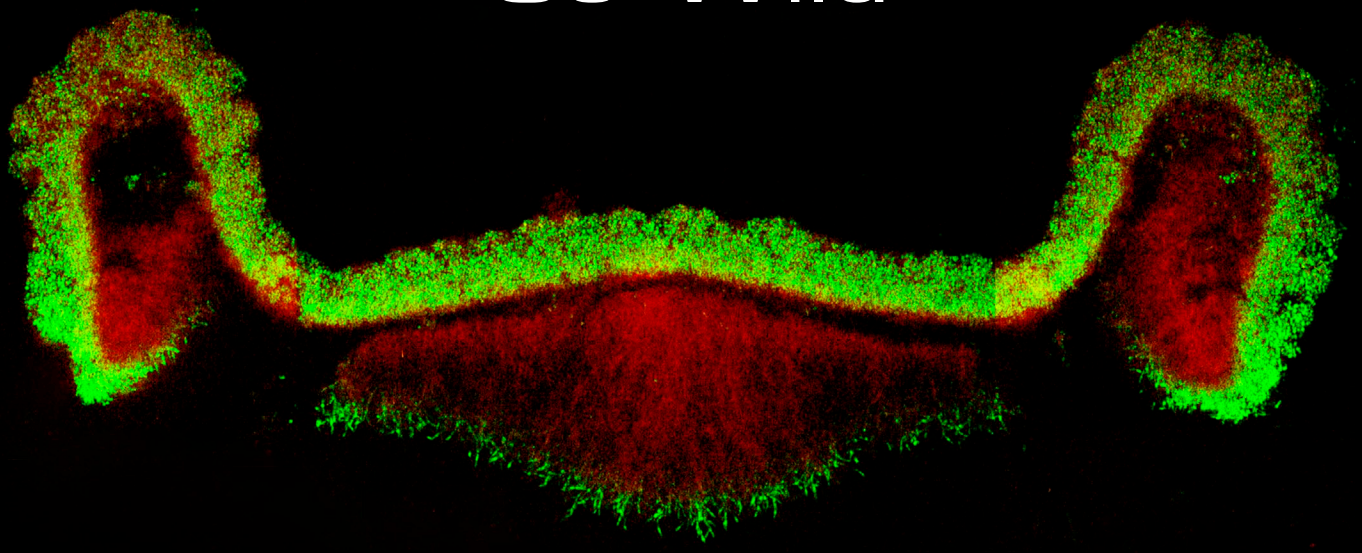
&

(ŠŤOVÍČEK et al., 2012)

Šťovíček V., Váchová L., Palková, Z. (2012): **Yeast biofilm colony as an orchestrated multicellular organism**. *Communicative & Integrative Biology* **5** (2):1-3.

JCB
THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY
VOL. 194, NO. 5, SEPTEMBER 5, 2011

Budding Yeast Colonies Go Wild



Arf1 and Vesicle Scission

DLK Directs Neuronal Degeneration

HIV-1 Disrupts Centromere Cohesion

Published August 29, 2011

Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies

Libuše Váchová,[1,2] Vratislav Šťovíček,[2] Otakar Hlaváček,[1] Oleksandr Chernyavskiy,[3] Luděk Štěpánek,[2] Lucie Kubínová,[3] and Zdena Palková[2]

[1]Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., 142 20 Prague, Czech Republic
[2]Faculty of Science, Charles University in Prague, 128 44 Prague, Czech Republic
[3]Institute of Physiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., 142 20 Prague, Czech Republic

Much like other microorganisms, wild yeasts preferentially form surface-associated communities, such as biofilms and colonies, that are well protected against hostile environments and, when growing as pathogens, against the host immune system. However, the molecular mechanisms underlying the spatiotemporal development and environmental resistance of biofilms and colonies remain largely unknown. In this paper, we show that a biofilm yeast colony is a finely tuned, complex multicellular organism in which specialized cells jointly execute multiple protection strategies. These include a Pdr1p-regulated mechanism whereby multidrug resistance transporters Pdr5p and Snq2p expel external compounds solely within the surface cell layers as well as developmentally regulated production by internal cells of a selectively permeable extracellular matrix. The two mechanisms act in concert during colony development, allowing growth of new cell generations in a well-protected internal cavity of the colony. Colony architecture is strengthened by intercellular fiber connections.

Introduction

In natural environments, microorganisms preferentially form organized multicellular communities, such as biofilms and colonies. These structures possess unique attributes that provide resistance against chemicals and other threats and also adaptability to changing conditions, allowing the community to survive in a hostile natural environment (Donlan and Costerton, 2002; Palková, 2004). Features implicated as being essential for the formation of complex fungal biofilms include adhesion to surfaces, the production of an ECM, multidrug resistance (MDR) plasma membrane transporters, and specialized cell subpopulations, such as stationary cells that are more resistant to various stresses (Douglas, 2003; Blankenship and Mitchell, 2006).

Cell–cell and cell–surface adhesion are often mediated by specific cell wall–adhesive glycophosphatidylinositol-anchored proteins (Dranginis et al., 2007). In *Saccharomyces cerevisiae*, the FLO family of protein adhesins is considered the most important, with pleiotropic Flo11p involved in cell adhesion to inert substrates (Verstrepen et al., 2004), filamentous growth (Lambrechts et al., 1996), and the formation of structured colonies (Vopálenská et al., 2010), flor biofilms (Ishigami et al., 2004), and mats (Reynolds and Fink, 2001). In contrast to Flo1p, Flo5p, and Flo9p, which are crucial for cell–cell adhesion during flocculation (Guo et al., 2000), the role of Flo11p in this process is strain specific (Bayly et al., 2005; Douglas et al., 2007). The ALS family and Hwp1p, which are related to FLO adhesins, mediate the adhesion of *Candida albicans* and are important for normal biofilm development (Nobile et al., 2008).

An ECM is exclusively present in structured *S. cerevisiae* colonies but not in their domesticated counterparts (Kuthan et al., 2003), and it is found in air–liquid flor biofilms (Zara et al., 2009). In addition, flocculating *S. cerevisiae* cells expressing the *FLO1* gene secrete a mixture of polysaccharides that blocks the permeation of large molecules (e.g., antibodies; Beauvais et al., 2009). In addition to these findings in *S. cerevisiae* populations, an ECM is regularly encountered in biofilms of *Candida* species (Baillie and Douglas, 2000). In both structured *S. cerevisiae* colonies and yeast biofilms, the ECM facilitates

L. Váchová and Z. Palková contributed equally to this paper.

Correspondence to Zdena Palková: zdenap@natur.cuni.cz; or Libuše Váchová: vachova@biomed.cas.cz

Abbreviations used in this paper: 2P-CM, two-photon excitation confocal microscopy; MDR, multidrug resistance; NR, Nile red.

© 2011 Váchová et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see http://www.rupress.org/terms). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).

Supplemental Material can be found at:
http://jcb.rupress.org/content/suppl/2011/08/24/jcb.201103129.DC1.html

The Rockefeller University Press $30.00
J. Cell Biol. Vol. 194 No. 5 679–687
www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201103129

Published August 29, 2011

the formation of pores for water and nutrient flow (Douglas, 2003; Kuthan et al., 2003) and protects the communities against dehydration (Flemming and Wingender, 2010).

S. cerevisiae MDR transporters belonging to the ATP-binding cassette family are involved in the ATP-dependent efflux of a wide variety of unrelated compounds, including drugs and other noxious substances. Deletions of these pumps lead to the cells becoming drug hypersensitive (Rogers et al., 2001; Sipos and Kuchler, 2006). The function of the MDR pumps in *S. cerevisiae* multicellular structures has not yet been examined. Flocculating cells up-regulate some MDR transporter genes (Smukalla et al., 2008), but their function in floc resistance remains undocumented. It has been shown, however, that *C. albicans* biofilms increase their expression of the MDR genes *CDR1*, *CDR2*, and *MDR1* (Ramage et al., 2002), and deletions of these genes decrease the resistance of biofilms (Mukherjee et al., 2003).

In contrast to the smooth colonies of laboratory strains, wild *S. cerevisiae* strains form structured colonies possessing attributes common to fungal biofilms and are hence referred to as biofilm colonies. Their attributes include the production of an ECM rich in polysaccharides and high water retention capacity and the production of the adhesin Flo11p for substrate adhesion and 3D architecture formation (Šťovíček et al., 2010). Using two-photon excitation confocal microscopy (2P-CM; Váchová et al., 2009) in combination with fluorescent protein tagging and staining methods, we show here the dynamics of colony development. Colony structure was composed of an aerial part with an internal cavity and subsurface pseudohyphae, was strengthened by intercellular fibers formed in the presence of Flo11p, and was protected by Pdr5p and Snq2p transporters together with an ECM that was secreted by internal cells.

Results and discussion

Spatiotemporal architecture of a biofilm colony

Examining the population of a wild *S. cerevisiae* BR-F strain, we show (Fig. 1) that a 25-h-old population of mostly rounded cells had already formed a small colony with short pseudohyphae (i.e., elongated cells joined into filaments; Gimeno et al., 1992) invading the agar at its base. Several hours later, an internal cavity appeared within the mound colony (Fig. 1 A, 34–42 h). The colony then expanded primarily horizontally with an elevated ridge at its margin (Fig. 1 A, the earlike structure in the cross section) and an internal cavity (Fig. 1 A, 48–60 h). The colony also formed abundant rootlike pseudohyphae that grew radially into the agar from its central bottom region (Fig. 1, A and B). Later, the central colony area further expanded horizontally, pushing the ridge apart (Fig. 1 A, 3 d), and the colony became cup shaped (Fig. S1 A). During this period, secondary roots began to grow from the base of the ridge, anchoring it to the agar. The continued horizontal growth of the central cell layer thereby led to its undulation and the formation of wrinkles (Fig. 1 A, 7 d; and Video 1), as also observed in some types of biofilms (Uppuluri et al., 2009). The architecture of structured colonies formed by various wild *S. cerevisiae* strains is comparable, thus indicating universal underlying principles.

The cells within colonies are interconnected by long, thin fibers that extend from cell walls and form a velcrolike structure (Figs. 1 E and S1 B). The fibers interconnect oval cells in the upper layer and pseudohyphae in the roots (Fig. S1 B). They can hold cells close to one another but can also be stretched up to 460 nm. These fibrous interconnections appear to be composed of two halves, each belonging to one of the interconnected cells, as they are more electron dense in the adhesion area. Adhesin Flo11p participates in the formation of the fibers, which are absent in colonies from the strain lacking Flo11p (BR-F–*flo11*; Fig. S1 B). Two Flo11p molecules are long enough to form a fiber interconnection 460 nm long, even if they are partially coiled, and they may aggregate into bundles via amyloid formation (Ramsook et al., 2010). Alternatively, the effect of Flo11p could be indirect, e.g., eliciting a change that leads to the production of other surface adhesins. The finding of velcrolike interconnections is of particular interest in *C. albicans*, in which brushlike fibrillar structures composed of long fibers (100–160 nm) were observed on the surface of cells growing in liquid cultures (Tokunaga et al., 1986), and an involvement of adhesins has been proposed (Klis et al., 2009). Much shorter fibers related to Flo1p were observed on the surface of flocculating *S. cerevisiae* cells (Beauvais et al., 2009).

To distinguish between the areas of dividing and stationary cells within the developing colony, we used two detection systems: (1) a BR-F–Hmg1p-GFP strain with a GFP gene fused to the *HMG1* gene encoding the hydroxymethylglutaryl-CoA reductase of the nuclear envelope (Koning et al., 1996), which exhibits typical distributions in dividing and stationary cells (Fig. 2 B), and (2) the BR-F–cdc3^{ts} strain with the ts mutation in the *CDC3* gene for septin (Fig. 2 A; Hartwell, 1971). Dividing cells were spread uniformly throughout the colonies that were 24–36 h old (Fig. 2 C). Beginning at ∼40 h, the colony became stratified with the upper cells becoming mostly stationary while the rest of the colony contained dividing cells (Fig. 2 D). In colonies that were 3 d old, the surface layers of the ridge and central plateau mostly consisted of stationary cells. The internal layers consisted of sporadically or slowly dividing, but still relatively young, cells, whereas only the ridge interior and the root bases and tips still contained actively dividing cells (Fig. 1, C and D). These observations demonstrate that clearly demarcated zones of dividing and nondividing cells are discernible within the structured colonies (Fig. 1 F).

Structured colony defense by MDR pumps

Unlike the smooth laboratory strain colony (Váchová et al., 2009), the biofilm colony was not covered by a protective cell monolayer (unpublished data). However, we did identify a distinct property of the surface cell layers that was important for protecting the population as a whole. Surface cells (visualized by ConA-AF [ConA conjugated with Alexa Fluor 488] cell wall staining in vertical transverse colony cross sections) could not be stained with Nile red (NR), which targets lipid granules and membranes (Greenspan and Fowler, 1985). This NR-free cell layer was present throughout the BR-F colony (Fig. 3, A and B),

Published August 29, 2011

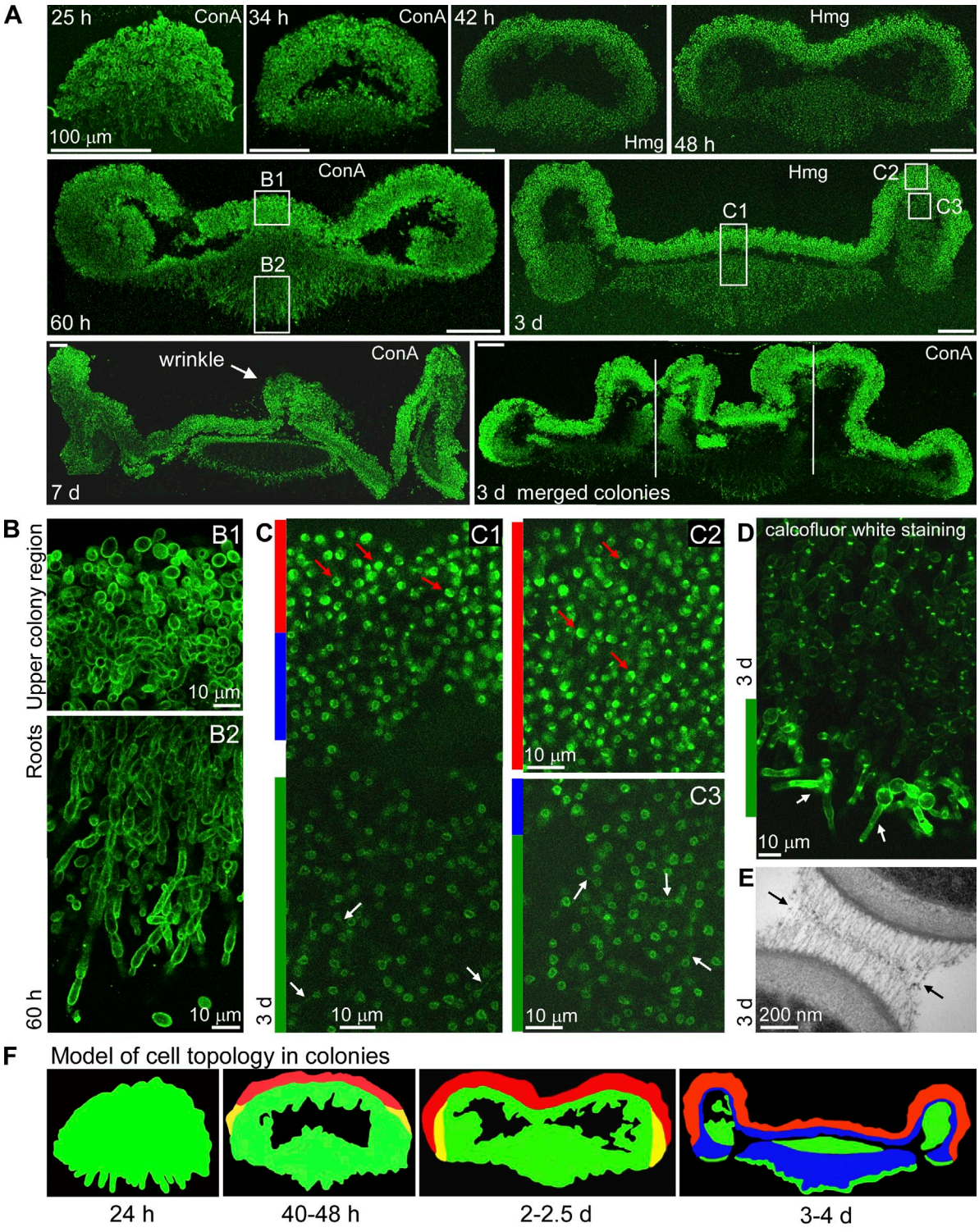


Figure 1. **Colony architecture and topology of different cell types.** (A) Vertical transverse cross sections of BR-F colonies stained with ConA-AF (ConA) and BR-F–Hmg1p-GFP (Hmg) colonies. Vertical white lines mark the borders of three individual colonies. (B) Typical morphology of cells in roots and the upper colony region (magnified regions are marked in A). (C) Cell morphology in BR-F–Hmg1p-GFP colonies. Areas with stationary (red bar), dividing (green bar), and young nondividing (blue bar) cells are shown. Arrows indicate examples of dividing (white) and stationary (red) cells (magnified regions are marked in A). (D) Distribution of dividing cells in root tips of BR-F–cdc3^{ts} colonies. Examples of cells reaching a terminal phenotype (Fig. 2 A) are marked by arrows. (E) Velcrolike interconnection (marked by arrows) between cells in the upper central region of 3-d-old colonies visualized by EM (more in Fig. S1). (F) Diagrammatic illustrations of the cell topology in the course of colony development (based on BR-F–Hmg1p-GFP and BR-F–cdc3^{ts} data; also see Fig. 2). Regions with dividing (green), early stationary (yellow), stationary (red), and younger with no apparent division activity (blue) cells are shown. Two (A, 60 h and 3 d) or three (A, 7- and 3-d merged colonies) individual images spanning the width of the colony were acquired and assembled after acquisition to generate the composite image shown. Details in B2 and C1 were obtained by composing two images of neighboring fields of view.

Published August 29, 2011

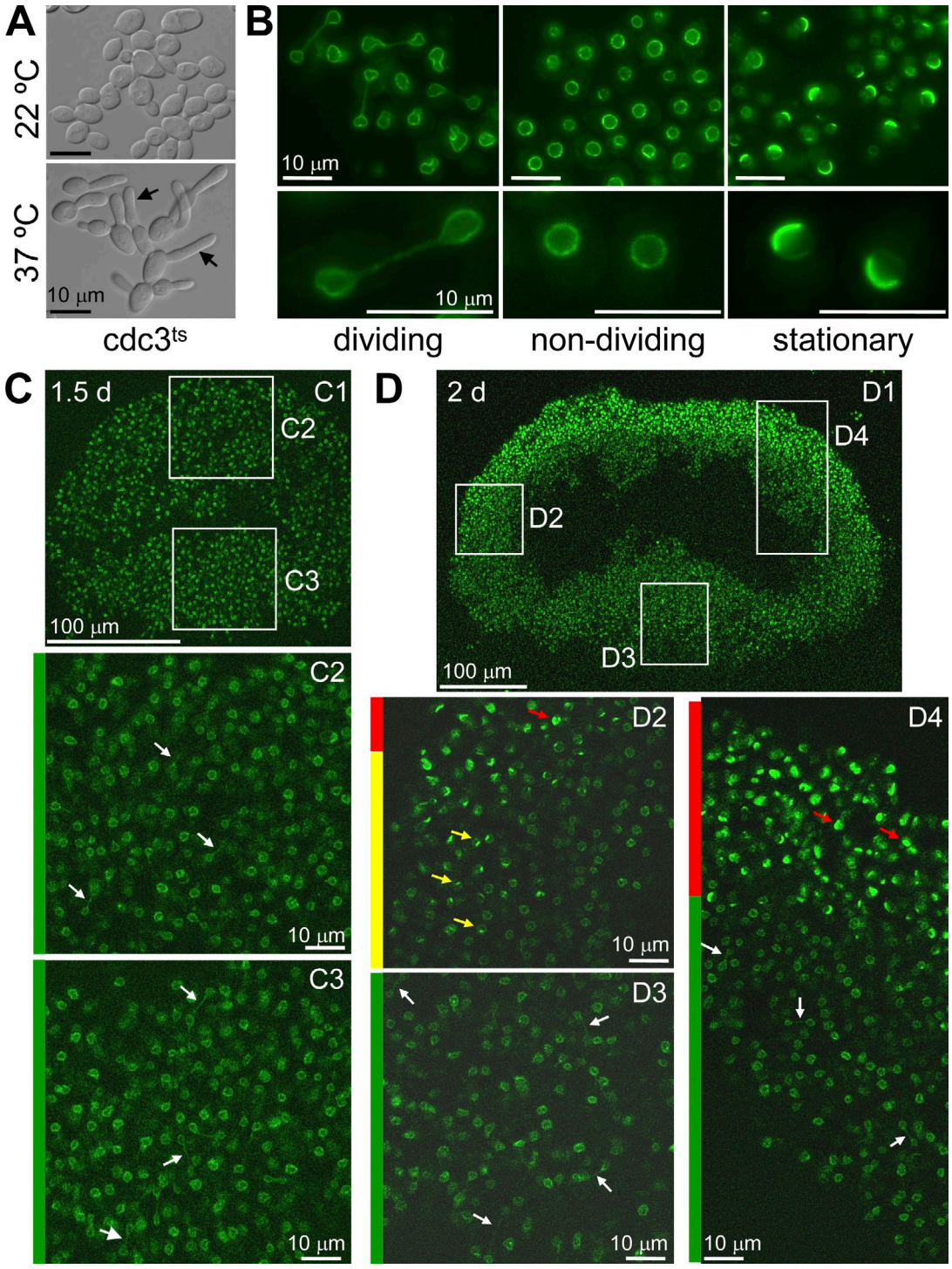
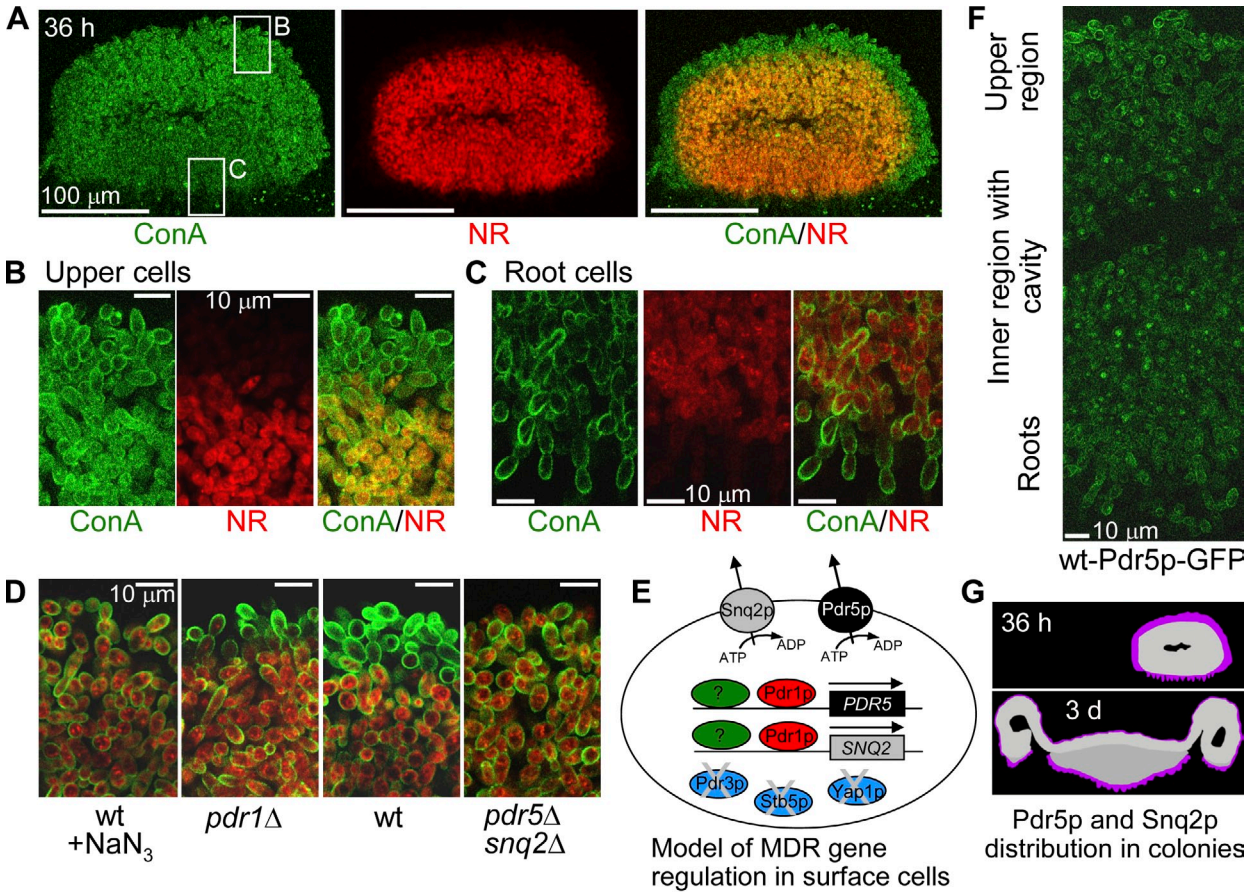


Figure 2. **Topology of dividing and stationary cells in colonies.** (A and B) Visualization of dividing, nondividing, and stationary cells. (A) Morphology of BR-F–cdc3^{ts} cells from liquid cultures grown for 2 h at permissive (22°C) and nonpermissive (37°C) temperature. Arrows indicate a typical morphology reached by dividing cells at 37°C. (B) Distribution of Hmg1p-GFP in dividing, nondividing, and stationary cells grown in liquid medium. (C and D) Cell topology in BR-F–Hmg1p-GFP colonies. Areas with stationary (red bars and arrows), early stationary (yellow bar and arrows), and dividing (green bars and white arrows) cells are shown. Arrows mark typical cell types. Magnified regions are marked with boxes. (C) A 1.5-d-old colony. (D) A 2-d-old colony. The detail in D4 was obtained by composing two images of neighboring fields of view.

including the pseudohyphae tips (Fig. 3 C). This layer was thick (17.8 ± 2.5 µm) in colonies 24–36 h old, persisted over the next 2 d, became thinner in the aerial part (11.5 ± 1.2 µm in a colony 3 d old), and, with the exception of the root tips, disappeared in older colonies (7 d old). After formaldehyde fixation or treatment with NaN_3 causing rapid cellular ATP depletion, entire colonies could be stained with NR (Fig. 3 D). This demonstrated that lipid particles are present in untreated colonies, but NR is probably removed from the surface cells. We considered MDR pumps to be prime candidates for this



H

STRAIN	wt	*pdr1*	*pdr3*	*pdr1 pdr3*	*pdr5*	*pdr5 snq2*	*pdr1 yap1*	*pdr1 stb5*	Pdr5p -GFP	Snq2p -GFP	Pdr10p -GFP	Pdr15p -GFP
NR extrusion	+	±	+	±	±	-	±	±				
Transporter localization[1]									YES	ND[2]	ND[2]	ND[2]

[1] Transporter in the plasma membrane of cells localized in the surface layer of colonies 1.5 d old
[2] GFP fluorescence signal not detected.

Figure 3. **Localization of active MDR pumps within colonies.** (A–D) Vertical transverse cross sections of BR-F colonies that were 36 h old, stained with ConA-AF (ConA) and NR. (A) A layer of NR-free cells covers the entire colony. (B and C) Details of the upper (B) and root (C) cells from the boxes in A are shown. (D) NR extrusion by the surface cell layer is reduced by removing the transcription factor Pdr1p and blocked by energy depletion (using NaN_3) or the absence of both Pdr5p and Snq2p MDR transporters. (E) A model of MDR gene regulation. (F) Pdr5p-GFP localization in the membrane of the upper cells and root tips compares well with that in the NR-free colony layer in A–C. (G) A model of Pdr5p and Snq2p distribution (violet) in colonies. (H) NR extrusion and transporter localization in colonies of different strains. wt, wild type.

process. Indeed, the disruption of the *PDR1* gene, encoding a transcription activator of some MDR transporters (Balzi et al., 1987; Fardeau et al., 2007), significantly diminished the removal of NR (Fig. 3 D). Deleting various combinations of genes coding for individual MDR pumps (Snq2p [Servos et al., 1993], Pdr5p [Balzi et al., 1994], and the latter's close relatives Pdr10p and Pdr15p [Wolfger et al., 1997]; Fig. 3 H and Table I) demonstrated that Pdr5p and Snq2p are essential for the extrusion of NR from the surface cells of colonies, as dye export was completely blocked in the BR-F–*pdr5snq2* strain (Fig. 3 D). Moreover, we demonstrated that the Pdr5p-GFP transporter was mainly present in the plasma membrane of cells located at the surface of BR-F–Pdr5p-GFP colonies that were 1.5 d old. Meanwhile, internal cells exhibited mostly vacuolar GFP fluorescence, which is indicative of Pdr5p degradation (Fig. 3 F). Deletions of other potential MDR regulator genes, *PDR3*, *STB5*, and *YAP1* (Jungwirth and Kuchler, 2006), in the BR-F–*pdr1* strain had no effect on Pdr5p/Snq2p function (Fig. 3 H). This indicates that the expression of *PDR5* and *SNQ2* in the surface layer of BR-F colonies is regulated by the Pdr1p transcription factor, probably jointly with an additional, yet unidentified, MDR gene regulator (Fig. 3 E). Together, these findings imply an important protective role of the surface cells equipped with Pdr5p, Snq2p, and possibly other MDR exporters in the removal of external toxic compounds (Fig. 3 G).

Published August 29, 2011

Table I. **Yeast strains used in this study**

Name	Genotype	Source
BR-F	*MATa/MATα*	Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences (collection no. CCY 21-4-97)
ts104	*MATa adelΔ ade2Δ uralΔ tyrlΔ his7Δ lysΔ gallΔ cdc3-1*	Charles University in Prague (collection no. DMUP 12-4-80)
BR-F–*pdr1*[a]	*MATa/MATα pdr1Δ::kanMX/pdr1Δ::nat1*	This study
BR-F–*pdr3*[a]	*MATa/MATα* pdr3Δ::*kanMX*/pdr3Δ::*nat1*	This study
BR-F–*pdr1pdr3*[a]	*MATa/MATα pdr1Δ::kanMX*/pdr1Δ::*nat1 pdr3Δ::hph*/pdr3Δ::*ble*	This study
BR-F–*pdr5*[a]	*MATa/MATα pdr5Δ::kanMX/pdr5Δ::nat1*	This study
BR-F–*pdr5snq2*[a]	*MATa/MATα pdr5Δ::kanMX/pdr5Δ::nat1 snq2Δ::hph/snq2Δ::ble*	This study
BR-F–*pdr1yap1*[a]	*MATa/MATα pdr1Δ::kanMX/pdr1Δ::nat1 yap1Δ::hph/yap1Δ::ble*	This study
BR-F–*pdr1stb5*[a]	*MATa/MATα pdr1Δ::kanMX/pdr1Δ::nat1 stb5Δ::hph/stb5Δ::ble*	This study
BR-F–P_{CUP1}-GFP[a]	*MATa/MATα HIS3/his3Δ::nat1*-P_{CUP1}-GFP	This study
BR-F–P_{GAL1}-GFP[a]	*MATa/MATα HIS3/his3Δ::nat1*-P_{GAL1}-GFP	This study
BR-F–Hmg1p-GFP[a]	*MATa/MATα HMG1*-EGFP-*kanMX/HMG1*	This study
BR-F–Pdr5p-GFP[a]	*MATa/MATα PDR5*-EGFP-*kanMX/PDR5*	This study
BR-F–Snq2p-GFP[a]	*MATa/MATα SNQ2*-EGFP-*kanMX/SNQ2*	This study
BR-F–Pdr10p-GFP[a]	*MATa/MATα PDR10*-EGFP-*kanMX/PDR10*	This study
BR-F–Pdr15p-GFP[a]	*MATa/MATα PDR15*-EGFP-*kanMX/PDR15*	This study
BR-F–*cdc3CDC3*[a]	*MATa/MATα cdc3Δ::kanMX/CDC3*	This study
BR-F–cdc3[ts] [b]	*MATa/MATα cdc3Δ::kanMX/cdc3-1-nat1*	This study
BR-F–*flo11*[c]	*MATa/MATα flo11Δ::kanMX/flo11Δ::ble*	This study

[a]Forms structured colonies. Their morphology is identical to that of the parental BR-F strain.
[b]Colonies grow more slowly at 22°C. Their morphology is identical to that of the parental BR-F strain.
[c]Forms smooth colonies.

Nutrient flow in the colony and its protection by ECM

In contrast to the tightly packed cells within smooth colonies, pores are present within structured colonies (Kuthan et al., 2003) that are similar to those allowing nutrient flow in biofilms (Douglas, 2003). To study nutrient flow within the biofilm colony, we set up detection systems based on the expression of GFP under the control of a regulatable promoter, P_{GAL1} or P_{CUP1}, in the BR-F strain (Table I). 45 min after feeding the colonies of such strains with the inductor (galactose or copper ions) from the agar side, GFP fluorescence was detected not only in the tips of the pseudohyphae (i.e., closest to the inductor) but also in all of the cells in the surface layer, implying a very efficient propagation of the inductor within the colony. Surprisingly, a majority of the root cells and internal parts of the ridge remained uninduced even after 5 h of induction (Fig. 4 A). However, all colony cells were induced when the exposed vertical transverse cross section of the colony was placed flat on agar soaked with the inductor (Fig. 4 C). Therefore, we hypothesize that the uninduced part of the colony produces an ECM (different from the velcrolike fibers that are present throughout the entire colony), completely blocking the penetration of certain chemical species, even small ones, to the inner parts of the intact colony. The low-permeable ECM begins to be produced in the central area of young (33–35 h old) colonies, and the area expands with the colony growth (Fig. 4 B).

In contrast to the zones of stationary cells that appear in the air-facing aerial part of the colony, the ECM prevents the penetration of chemicals from both the aerial and subsurface colony parts. The existence of the ECM is supported by the earlier scanning EM observation of an abundant extracellular material containing a sugar component (Kuthan et al., 2003). A microscopically similar ECM of *C. albicans* species biofilm (Al-Fattani and Douglas, 2006) and the extracellular glucan of *C. albicans* biofilm sequestering antifungals (Nett et al., 2010) both contribute to the biofilm drug resistance.

A model of biofilm colony formation and protection

These developmental principles, as revealed in this study, provide new insights into the differentiation of a biofilm colony and the function of specialized cell subpopulations, and they suggest the presence of unique mechanisms of population protection (Video 2). What are the colony strategies? A colony arising from a single cell grows very quickly, as most cells efficiently divide. In contrast to a smooth laboratory strain colony, biofilm colony also expands substantially in the vertical direction. This expansion may be enabled by the velcrolike interconnection of its cells. Initially, the colony population protects itself from external chemical threats by inducing MDR exporters (Fig. S2) capable of removing toxic compounds (Sipos and Kuchler, 2006). Later, the activity of the exporters persists exclusively in the surface cell layers over the entire colony, and, in parallel, additional protection strategies are initiated. The upper cell layers of the aerial part of the colony become stationary and thus more resistant to chemical and other threats. As the nutrients from agar are efficiently transported, the formation of such nondividing cells appears to be not simply the result of nutrient exhaustion but, more likely, a regulated process that helps to protect the colony surface that is directly exposed to the open air. In parallel, the internal cells near the agar begin to produce the ECM.

The preservation of the velcrolike joints then contributes to the mechanical stability of the expanding colony and may

Published August 29, 2011

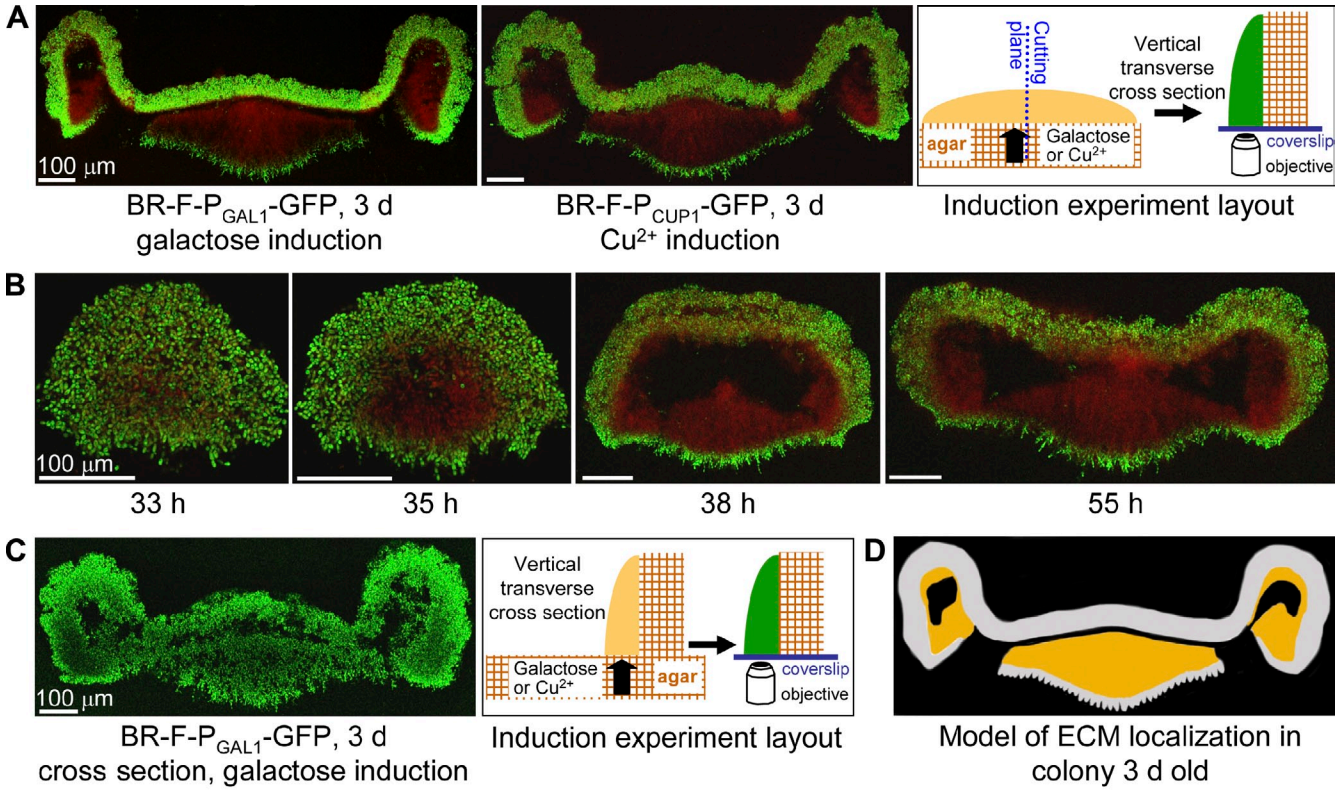


Figure 4. **Nutrient flow and localization of ECM within colonies.** Vertical transverse colony cross sections. (A) Areas of galactose or Cu^{2+} induction in colonies (the vertical arrow indicates diffusion into the colony). (B) Timeline of ECM formation. (A and B) Green, GFP fluorescence marks areas in which the inducer reached the cells; red, autofluorescence of all colony cells visible in areas where ECM prevented the inducer from accessing the cells. Intact colonies were induced from the bottom by placing them for 5 h on agar soaked with 2% galactose or 5 mM $CuSO_4$. GFP fluorescence was detectable by 2P-CM as early as 45 min after induction. (C) The exposed area of the vertical transverse colony section was placed flat on galactose-soaked agar (a 2-h induction), after which internal cells were induced as well. (D) A model scheme featuring impermeable ECM (yellow). Two (B [55 h] and C) or three (A) individual images spanning the width of the colony were acquired and assembled after acquisition to generate the composite image shown.

lend flexibility to the layer, forming aerial wrinkles with internal cavities. Subsequent cell generations formed by the dividing inner cells of that layer are thus well protected. The cells in the inner bottom part of the ridge and the pseudohyphae in the subsurface colony regions do not enter a stationary phase. Rather, they continue to produce the ECM that is impermeable to some small compounds such as galactose and to harmful chemicals such as copper ions. Only the pseudohyphae tips protrude from the ECM, but these are still protected by the MDR exporters. The tips may function as the sensors of nutrients and other environmental stimuli important to the colony. The questions remain as to what the chemical nature of the ECM is and how the embedded cells access the nutrients that are essential for their growth. It was previously shown that the ECMs of various microorganisms function as sorptive sponges that sequester organic molecules close to the cells (Decho, 2000) and that they also bind and sequester drugs (Nett et al., 2010). Yeast ECMs vary by their content of different polymeric and monomeric carbohydrates, proteins, and phosphorus (Al-Fattani and Douglas, 2006) and are even preferentially grazed by ciliates (Joubert et al., 2006), suggesting that ECMs have nutritional value. Thus, we hypothesize that in the biofilm colony, the ECM itself may function both as a sequestration barrier and a nutrient pool essential for new cell progeny within the cavities.

In conclusion, the specific architecture of the biofilm colony enables multiple protection strategies (Video 2), yielding a high level of resistance in the wild. Importantly, some of the colony features that we have shown here (e.g., a specific growth pattern, the production of the ECM, and drug efflux pumps) are the traits that are also implicated in the formation of complex fungal biofilms (Blankenship and Mitchell, 2006). The structured yeast colony thus represents a well-defined and powerful in vivo model system that may help to uncover the underlying general principles of microbial biofilm formation.

Materials and methods

Yeast strains and media

The wild yeast strain BR-F was supplied from a collection of the Institute of Chemistry (Slovak Academy of Sciences). The temperature-sensitive mutant strain ts104 was obtained from a collection of Charles University in Prague. All other strains were derivatives of the BR-F strain and were prepared in this study (Table I). Colonies were grown on GMA (3% glycerol, 1% yeast extract, and 2% agar) at 28°C unless otherwise indicated.

Strain constructs

Strains with gene deletions, C-terminal GFP fusions, and artificial-promoter (P_{CUP1} and P_{GAL1}) constructs replacing the *HIS3* gene were prepared according to Gueldener et al. (2002) and Sheff and Thorn (2004) by transforming the cells with DNA cassettes generated by PCR that used the primers and plasmids listed in Tables S1 and S2. The *cdc3-1* allele from the ts104 strain was first cloned into the pFA6a-natNT2 vector using BamHI and AscI restriction enzymes. The DNA cassette was then

amplified and used to replace the wild-type *CDC3* allele in the BR-F–*cdc3CDC3* strain. Yeast cells were transformed as described by Gietz and Woods (2002).

Fluorescence microscopy of cells and colony imaging

Cells in the cultivation medium were examined at RT under a microscope (DMR; Leica) equipped with a 100×/1.3 oil objective and a GFP filter or Nomarski contrast and then photographed with a charge-coupled device camera (ProgRes MFcool; Jenoptik; Figs. 2 [A and B] and S2). Colony images were captured in incident light with a Navitar objective and a complementary metal-oxide semiconductor camera (ProgRes CT3; Jenoptik; Fig. S1 A). Time-lapse experiments were performed using a camera (DS-5M; Nikon) with a Navitar 12× objective and light-emitting diode illumination (Video 1). NIS-Elements software (Laboratory Imaging) was used throughout.

2P-CM

2P-CM (Figs. 1 [A–D], 2 [C and D], 3 [A–D and F], and 4 [A–C]) was performed according to Váchová et al. (2009). In brief, colonies were embedded in low-gelling agarose directly on the plates at RT and cut vertically down the middle. They were placed on the coverslip (the cutting edge to the glass), and the colony side views were obtained by 2P-CM. When required, the cross sections were stained with the following fluorescent dyes: 2.5 µg/ml NR, 30 µg/ml ConA-AF, and 1 µg/ml calcofluor white. Alternatively, GFP fluorescence was monitored. Images were acquired at RT with a true confocal scanner microscope (SP2 AOBS MP; Leica) fitted with a mode-locked laser (Ti:Sapphire Chameleon Ultra; Coherent Inc.) for two-photon excitation and using 20×/0.70 and 63×/1.20 water immersion plan apochromat objectives. Excitation wavelengths of 920 nm were used for ConA-AF, NR, and GFP, and wavelengths of 790 nm were used for calcofluor white. Emission bandwidths were set to 470–540 nm for ConA, 580–750 nm for NR, 480–595 nm for GFP, and 400–550 nm for calcofluor white. An overview of the morphology of colonies and individual cells was obtained simultaneously with green fluorescence as autofluorescence in the 600–740-nm wavelength range. Images of colonies older than 2 d were composed of two or three stitched fields of view. Details in Fig. 1 (B2 and C1) and Fig. 2 (D4) were obtained by composing two images from neighboring fields of view.

EM

Small blocks (~1 mm^3) of colonies embedded in a 2% agarose gel were fixed by glutaraldehyde/potassium permanganate according to Wright (2000) and embedded in PolyBed 812 (Polysciences, Inc.). Using a transmission electron microscope (1011; JEOL Ltd.) at 80 kV, 70-nm ultrathin sections (prepared on a Reichert-Jung ultramicrotome) stained by uranyl acetate and lead citrate were examined. Images (Figs. 1 E and S1 B) were acquired by a digital camera (MegaView III) and AnalySIS software (Olympus).

Online supplemental material

Fig. S1 shows the differences between parental BR-F and knockout BR-F–*flo11* strains. Fig. S2 shows the early production of Pdr5p-GFP. Tables S1 and S2 list primers and plasmids used in this study, respectively. Video 1 shows BR-F colony growth. Video 2 shows flash animations of biofilm colony development and defense strategies. Online supplemental material is available at http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201103129/DC1.

We thank Dr. R. Pelc for helpful comments on the manuscript and H. Žd'árská for technical assistance.

The study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant 204/08/0718 to Z. Palková and L. Váchová) and the Ministry of Education (grant LC531 to Z. Palková and L. Váchová; grant LC06063 to Z. Palková and L. Kubínová; grant MSM0021620858 to Z. Palková and V. Šťovíček; grant AV0Z50200510 to L. Váchová and O. Hlaváček; and grant AV0Z50110509 to L. Kubínová). Z. Palková is a Howard Hughes Medical Institute International Research Scholar.

Submitted: 24 March 2011
Accepted: 1 August 2011

References

Al-Fattani, M.A., and L.J. Douglas. 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J. Med. Microbiol.* 55:999–1008. doi:10.1099/jmm.0.46569-0

Baillie, G.S., and L.J. Douglas. 2000. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:397–403. doi:10.1093/jac/46.3.397

Balzi, E., W. Chen, S. Ulaszewski, E. Capieaux, and A. Goffeau. 1987. The multidrug resistance gene *PDR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 262:16871–16879.

Balzi, E., M. Wang, S. Leterme, L. Van Dyck, and A. Goffeau. 1994. *PDR5*, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator *PDR1*. *J. Biol. Chem.* 269:2206–2214.

Bayly, J.C., L.M. Douglas, I.S. Pretorius, F.F. Bauer, and A.M. Dranginis. 2005. Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEM. Yeast Res.* 5:1151–1156. doi:10.1016/j.femsyr.2005.05.004

Beauvais, A., C. Loussert, M.C. Prevost, K. Verstrepen, and J.P. Latgé. 2009. Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in *FLO1*-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEM. Yeast Res.* 9:411–419. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00482.x

Blankenship, J.R., and A.P. Mitchell. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:588–594. doi:10.1016/j.mib.2006.10.003

Decho, A.W. 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont. Shelf Res.* 20:1257–1273. doi:10.1016/S0278-4343(00)00022-4

Donlan, R.M., and J.W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167–193. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002

Douglas, L.J. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 11:30–36. doi:10.1016/S0966-842X(02)00002-1

Douglas, L.M., L. Li, Y. Yang, and A.M. Dranginis. 2007. Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion. *Eukaryot. Cell.* 6:2214–2221. doi:10.1128/EC.00284-06

Dranginis, A.M., J.M. Rauceo, J.E. Coronado, and P.N. Lipke. 2007. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:282–294. doi:10.1128/MMBR.00037-06

Fardeau, V., G. Lelandais, A. Oldfield, H. Salin, S. Lemoine, M. Garcia, V. Tanty, S. Le Crom, C. Jacq, and F. Devaux. 2007. The central role of *PDR1* in the foundation of yeast drug resistance. *J. Biol. Chem.* 282:5063–5074. doi:10.1074/jbc.M610197200

Flemming, H.C., and J. Wingender. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:623–633.

Gietz, R.D., and R.A. Woods. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350:87–96. doi:10.1016/S0076-6879(02)50957-5

Gimeno, C.J., P.O. Ljungdahl, C.A. Styles, and G.R. Fink. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell.* 68:1077–1090. doi:10.1016/0092-8674(92)90079-R

Greenspan, P., and S.D. Fowler. 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red. *J. Lipid Res.* 26:781–789.

Gueldener, U., J. Heinisch, G.J. Koehler, D. Voss, and J.H. Hegemann. 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 30:e23. doi:10.1093/nar/30.6.e23

Guo, B., C.A. Styles, Q. Feng, and G.R. Fink. 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:12158–12163. doi:10.1073/pnas.220420397

Hartwell, L.H. 1971. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* 69:265–276. doi:10.1016/0014-4827(71)90223-0

Ishigami, M., Y. Nakagawa, M. Hayakawa, and Y. Iimura. 2004. *FLO11* is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of *NRG1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237:425–430.

Joubert, L.M., G.M. Wolfaardt, and A. Botha. 2006. Microbial exopolymers link predator and prey in a model yeast biofilm system. *Microb. Ecol.* 52:187–197. doi:10.1007/s00248-006-9063-7

Jungwirth, H., and K. Kuchler. 2006. Yeast ABC transporters–a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett.* 580:1131–1138. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.050

Klis, F.M., G.J. Sosinska, P.W. de Groot, and S. Brul. 2009. Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEM. Yeast Res.* 9:1013–1028. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00541.x

Koning, A.J., C.J. Roberts, and R.L. Wright. 1996. Different subcellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* HMG-CoA reductase isozymes at elevated levels corresponds to distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations. *Mol. Biol. Cell.* 7:769–789.

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

Lambrechts, M.G., F.F. Bauer, J. Marmur, and I.S. Pretorius. 1996. Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:8419–8424. doi:10.1073/pnas.93.16.8419

Mukherjee, P.K., J. Chandra, D.M. Kuhn, and M.A. Ghannoum. 2003. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect. Immun.* 71:4333–4340. doi:10.1128/IAI.71.8.4333-4340.2003

Nett, J.E., H. Sanchez, M.T. Cain, and D.R. Andes. 2010. Genetic basis of *Candida biofilm* resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J. Infect. Dis.* 202:171–175. doi:10.1086/651200

Nobile, C.J., H.A. Schneider, J.E. Nett, D.C. Sheppard, S.G. Filler, D.R. Andes, and A.P. Mitchell. 2008. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr. Biol.* 18:1017–1024. doi:10.1016/j.cub.2008.06.034

Palková, Z. 2004. Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO Rep.* 5:470–476. doi:10.1038/sj.embor.7400145

Ramage, G., S. Bachmann, T.F. Patterson, B.L. Wickes, and J.L. López-Ribot. 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 49:973–980. doi:10.1093/jac/dkf049

Ramsook, C.B., C. Tan, M.C. Garcia, R. Fung, G. Soybelman, R. Henry, A. Litewka, S. O'Meally, H.N. Otoo, R.A. Khalaf, et al. 2010. Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryot. Cell*. 9:393–404. doi:10.1128/EC.00068-09

Reynolds, T.B., and G.R. Fink. 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*. 291:878–881. doi:10.1126/science.291.5505.878

Rogers, B., A. Decottignies, M. Kolaczkowski, E. Carvajal, E. Balzi, and A. Goffeau. 2001. The pleitropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3:207–214.

Servos, J., E. Haase, and M. Brendel. 1993. Gene *SNQ2* of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. *Mol. Gen. Genet.* 236:214–218. doi:10.1007/BF00277115

Sheff, M.A., and K.S. Thorn. 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae. Yeast*. 21:661–670. doi:10.1002/yea.1130

Sipos, G., and K. Kuchler. 2006. Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification. *Curr. Drug Targets*. 7:471–481. doi:10.2174/138945006776359403

Smukalla, S., M. Caldara, N. Pochet, A. Beauvais, S. Guadagnini, C. Yan, M.D. Vinces, A. Jansen, M.C. Prevost, J.P. Latgé, et al. 2008. *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell*. 135:726–737. doi:10.1016/j.cell.2008.09.037

Šťovíček, V., L. Váchová, M. Kuthan, and Z. Palková. 2010. General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genet. Biol.* 47:1012–1022. doi:10.1016/j.fgb.2010.08.005

Tokunaga, M., M. Kusamichi, and H. Koike. 1986. Ultrastructure of outermost layer of cell wall in *Candida albicans* observed by rapid-freezing technique. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 35:237–246.

Uppuluri, P., A.K. Chaturvedi, and J.L. Lopez-Ribot. 2009. Design of a simple model of *Candida albicans* biofilms formed under conditions of flow: development, architecture, and drug resistance. *Mycopathologia*. 168:101–109. doi:10.1007/s11046-009-9205-9

Váchová, L., O. Chernyavskiy, D. Strachotová, P. Bianchini, Z. Burdíková, I. Fercíková, L. Kubínová, and Z. Palková. 2009. Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ. Microbiol.* 11:1866–1877. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01911.x

Verstrepen, K.J., T.B. Reynolds, and G.R. Fink. 2004. Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:533–540. doi:10.1038/nrmicro927

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

Wolfger, H., Y. Mahé, A. Parle-McDermott, A. Delahodde, and K. Kuchler. 1997. The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes *PDR10* and *PDR15* are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators. *FEBS Lett.* 418:269–274. doi:10.1016/S0014-5793(97)01382-3

Wright, R. 2000. Transmission electron microscopy of yeast. *Microsc. Res. Tech.* 51:496–510. doi:10.1002/1097-0029(20001215)51:6<496::AID-JEMT2>3.0.CO;2-9

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

Communicative & Integrative Biology 5:2, 1–3; March/April 2012; © 2012 Landes Bioscience

Yeast biofilm colony as an orchestrated multicellular organism

Vratislav Šťovíček,[1] Libuše Váchová[1,2] and Zdena Palková[1,*]

[1]Department of Genetics and Microbiology; Faculty of Science; Charles University in Prague; Prague, Czech Republic; [2]Institute of Microbiology AS CR, v.v.i.; Prague, Czech Republic

Although still often considered as simple unicellular organisms, in natural settings yeast cells tend to organize into intricate multicellular communities. Due to specific mechanisms only feasible at the population level, their capacity for social behavior is advantageous for their survival in a harmful environment. Feral *Saccharomyces cerevisiae* strains form complex structured colonies, which display many properties typical of natural biofilms causing (among others) serious infections in the human body. In our recent paper, we looked inside a growing colony using two-photon confocal microscopy. This allowed us to elucidate its three-dimensional colony architecture and some mechanisms responsible for community protection. Moreover, we showed how particular protective mechanisms complement each other during colony development and how each of them contributes to its defense against attacks from the environment. Our findings broaden current understanding of microbial multicellularity in general and also shed new light on the enormous resistance of yeast biofilms.

© 2012 Landes Bioscience. Do not distribute.

Keywords: structured colony, *Saccharomyces cerevisiae*, feral strains, biofilm, drug efflux pumps, extracellular matrix

Submitted: 11/30/11

Accepted: 12/01/11

http://dx.doi.org/10.4161/cib.5.2.18912

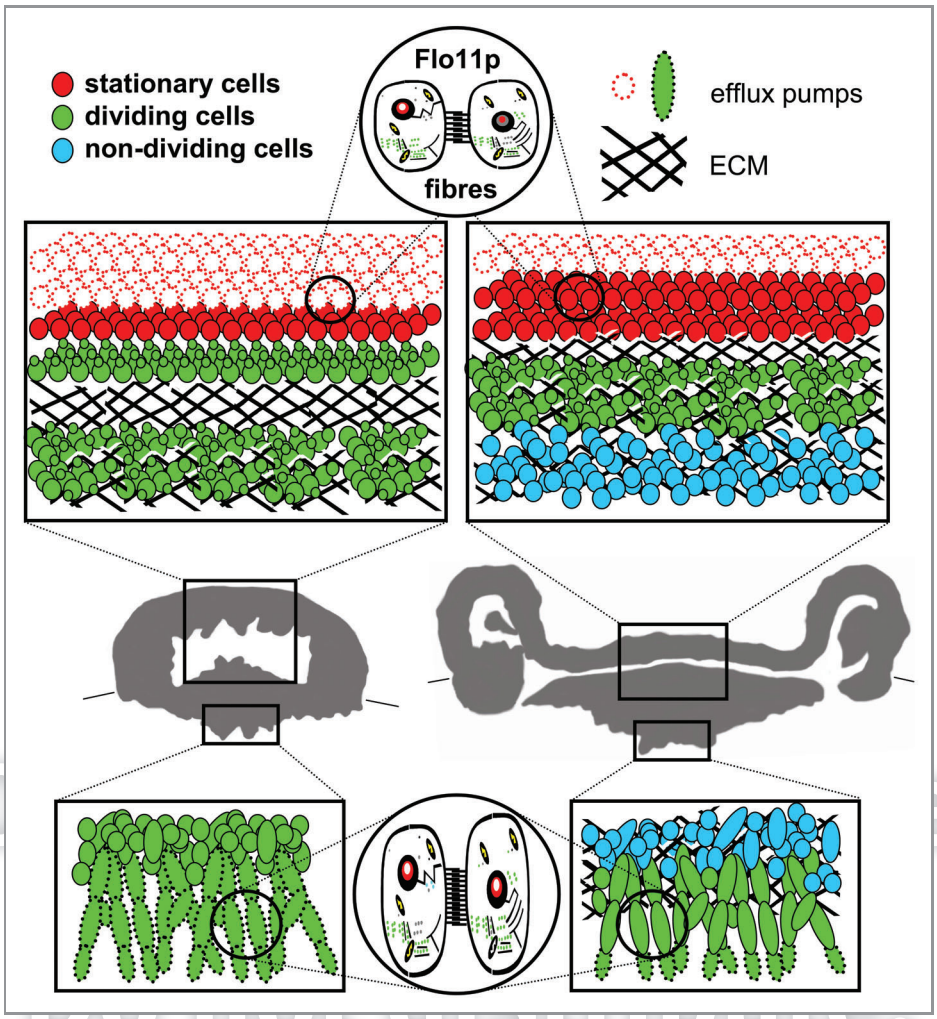
*Correspondence to: Zdena Palková; Email: zdenap@natur.cuni.cz

Addendum to: Váchová L, Stovícek V, Hlavácek O, Chernyavskiy O, Štěpánek L, Kubínová L, et al. Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. J Cell Biol 2011; 194:679–87; PMID:21875945; http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201103129

Microbial multicellular communities can be found in various (even extreme) environments in the wild.[1] Yeast cells can form diverse structures when attached to solid surfaces (e.g., biofilms,[2] colonies[3]), when growing at a liquid/air interface (e.g., cell films on the surface of sherry wine that are called "flors"[4]) or when they mutually interact in a liquid environment and form cell clumps called "flocs"[5]. Each of these structures possesses some level of internal cell organization and complexity connected with the formation of differentiated cell subpopulations and also possesses a significant resistance to environmental impacts. Pathogenic yeasts (i.e., of Candida sp.) can colonise various surfaces within the human body, including host tissues and artificial medical devices, and form biofilms that resist otherwise effective drug therapy. Biofilms are thus very difficult to eliminate and serve as a source of serious systemic infections.[6,7] The questions of how yeast multicellular populations orchestrate their development and how they achieve their environmental protection are therefore also important in terms of medical care. However, as it is difficult to grow artificial biofilms in the laboratory that have properties similar to those of fully developed natural biofilms, many aspects of biofilm formation are still rather elusive.

Single cells of feral *S. cerevisiae* strains plated on solid medium retain the ability to develop into structured colonies with typical "fluffy" morphology[3,8] within a couple of days of growth. As shown below, such colonies share many properties with natural biofilms, and we therefore call them biofilm colonies. The biofilm colony model enabled us to discover the spatio-temporal localization of specific cell subpopulations with different functions and determine their impact on the protection and survival of the whole colony.

After relatively few cell divisions occur and a simple mound colony is formed, particular cell subpopulations begin to diverge and play different roles. Cells at the colony base form elongated cell chains called pseudohyphae.[9] These filaments invade the agar medium, anchoring the structure to the solid substrate. Cells in peripheral layers surrounding the entire colony (including subsurface parts) are



© 20 ence. Do not distribute.

Figure 1. Internal structure of colony of feral *Saccharomyces cerevisiae* strain. Thirty-six h-old (left) and 72 h-old (right) colony. Boxes in vertical colony cross-sections summarize structure and function of cell subpopulations in upper aerial and bottom subsurface colony parts; the localization of dividing, non-dividing and stationary cells is depicted, as well as cells with active drug efflux pumps Pdr5p and Snq2p. The presence of ECM is marked with black line hatching. Flo11p-dependent fibers interconnect cells in both aerial and subsurface colony parts.

equipped with drug-efflux pumps (Pdr5p and Snq2p) localized to the plasma membrane, the expression of which is controlled by Pdr1p together with another, as yet unidentified transcription factor (**Fig. 1**). These proteins that belong to the family of pleiotropic drug resistance membrane transporters are capable of removing various (including toxic) substances from the cells[10] and protect them (and thus also the whole colony) against external attacks. It has been demonstrated that various drug-efflux pumps play a role in yeast biofilm resistance against extracellularly added toxic compounds. However, this has usually been based on the overall change in behavior of mutated strains or expression differences between biofilms and planktonic cells,[11,12] without more detailed information on the transporter's function over the course of community development. In addition to the presence of these pumps, cells at the surface layers of the aerial colony part enter the stationary phase and thus become more resistant to potential environmental stress (**Fig. 1**). Meanwhile, cells in internal colony areas start to produce extracellular polymeric matrix (ECM; **Figure 1**) of unknown composition and thus become fully embedded in this matrix. The ECM apparently adopts the role of a protective barrier, because it blocks the penetration of even harmful compounds. ECM is one of the defining components of many yeast multicellular communities including biofilms.[2,13,14] Despite the sequestration potential of the ECM in clinical biofilms being implied,[15,16] its contribution to biofilm resistance is unclear and sometimes even doubted.[7,17] As a colony develops, the area of cells embedded in ECM expands (**Fig. 1**); in later stages, the ECM encloses almost all colony cells. Complementarily, the layer of cells containing functional drug-efflux pumps surrounding the colony becomes thinner as the transporters are degraded (**Fig. 1**) and almost completely disappears in an older, fully developed colony. Only the tips of the pseudohyphae in the agar not covered with ECM still maintain functional drug efflux pumps on the membrane, thus enabling the active defense of these exposed cells.

From the early developmental stage (34–42 h), a cell-free cavity in the colony interior is formed. As the timing of its formation correlates with the appearance of ECM, we can speculate that the cavity could be filled with ECM. The ECM may also be involved in the storage of water and possibly nutrients, as the extracellular material isolated from colonies possesses a high water retention capacity.[8] Moreover, it may provide a porous nutrient-rich space for dividing cells in the colony interior. Together with the division of internal cells, site-specific ECM production and its subsequent swelling can lead to rapid colony expansion in both the horizontal and vertical direction. As a result, the aerial surface layer undulates and forms ridges containing other cavities, giving the colony its typical "fluffy" appearance.

In addition to ECM that may provide stability to the 3-D colony structure, the flexibility and undulation of the surface colony layer could be dependent on the presence of fibrous interconnections between the cells. These interconnections are observed throughout the entire colony, including subsurface filamentous cells invading the agar (**Fig. 1**). Cell-cell and cell-substrate adhesion is another feature typical of multicellular communities[18,19] and is often ascribed as a function of cell wall adhesive proteins, including the FLO family of *S. cerevisiae*.[19,20] From mutants in individual FLO genes, only those lacking *FLO11* are unable to develop a 3D colony architecture and they form smooth and flat colonies.[8,21] Δ*flo11* colonies also lack intercellular connections, suggesting that Flo11p has a unique function in the formation of fibrous cell-cell interconnections in biofilm colonies.

In plentiful and stable laboratory conditions, colonies no longer need the traits described above. They are therefore switched off and energy, otherwise consumed in e.g., the production of an ECM rich in polysaccharides, could be used in a more profitable way.[1] Thus, laboratory and domesticated strains (those arising after passages of feral strains on complex media)[3] form non-adhesive, smooth flat colonies expanding predominantly in the horizontal direction.[3,8,22] Cells within such colonies are tightly packed and neither pores nor cavities can be observed.[3,22] In contrast, the strategy of feral strains is to quickly occupy territory ahead of competitors, to build a complex structure protected by several cooperating mechanisms so as to provide a sheltered space for new cell generations. Despite the high energy costs, it is advantageous to build such a complicated structure, because it enables the community to effectively cope with a hostile environment. Thus, a structured biofilm yeast colony should be considered to be a multicellular organism, where everything is subordinated to the success of the community, regardless of individual cell fate.

Acknowledgments

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic 204/08/0718 and the Ministry of Education LC531, LC06063; MSM0021620858 and AV0Z50200510.

© 2012 Landes Bioscience. Do not distribute

References

1. Palková Z. Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. EMBO Rep 2004; 5:470-6; PMID: 15184977; http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400145
2. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol 2006; 9:588-94; PMID:17055772; http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.003
3. Kuthan M, Devaux F, Janderová B, Slaninová I, Jacq C, Palková Z. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. Mol Microbiol 2003; 47:745-54; PMID:12535073; http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03332.x
4. Ibeas JI, Lozano I, Perdigones F, Jimenez J. Dynamics of Flor Yeast Populations During the Biological Aging of Sherry Wines. Am J Enol Vitic 1997; 48:75-9.
5. Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, et al. FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. Cell 2008; 135:726-37; PMID:19013280; http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.037
6. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 2003; 11:30-6; PMID:12526852; http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00002-1
7. d'Enfert C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. Curr Drug Targets 2006; 7:465-70; PMID:16611034; http://dx.doi.org/10.2174/138945006776359458
8. Sťovíček V, Váchová L, Kuthan M, Palková Z. General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. Fungal Genet Biol 2010; 47:1012-22; PMID:20728557; http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.005
9. Gancedo JM. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev 2001; 25:107-23; PMID:11152942; http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00573.x
10. Wolfger H, Mamnun YM, Kuchler K. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. Res Microbiol 2001; 152:375-89; PMID:11421285; http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01209-8
11. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother 2002; 49:973-80; PMID:12039889; http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkf049
12. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. Infect Immun 2003; 71:4333-40; PMID:12874310; http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.8.4333-4340.2003
13. Beauvais A, Schmidt C, Guadagnini S, Roux P, Perret E, Henry C, et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. Cell Microbiol 2007; 9:1588-600; PMID:17371405; http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00895.x
14. Zara G, Zara S, Pinna C, Marceddu S, Budroni M. *FLO11* gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of Saccharomyces cerevisiae. Microbiology 2009; 155:3838-46; PMID:19729408; http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.028738-0
15. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol 2006; 55:999-1008; PMID:16849719; http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46569-0
16. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. J Infect Dis 2010; 202:171-5; PMID: 20497051; http://dx.doi.org/10.1086/651200
17. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. Cell Microbiol 2006; 8:1382-91; PMID:16848788; http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00761.x
18. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. Curr Biol 2008; 18:1017-24; PMID:18635358; http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.034
19. Brückner S, Mösch HU. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev 2012; 36:25-58; PMID:21521246; http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00275.x
20. Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. Mol Microbiol 2006; 60:5-15; PMID:16556216; http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x
21. Vopálenská I, Sťovícek V, Janderová B, Váchová L, Palková Z. Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. Environ Microbiol 2010; 12:264-77; PMID:19799621; http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02067.x
22. Váchová L, Chernyavskiy O, Strachotová D, Bianchini P, Burdíková Z, Fercíková I, et al. Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. Environ Microbiol 2009; 11:1866-77; PMID:19302539; http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01911.x

5.4. Genetické parametry fenotypové heterogenity přírodních kmenů kvasinek

Poměrně často pozorovanou vlastností přírodních populací mikroorganismů je ztráta řady vlastností, které jim umožňují tvorbu komplexních mnohobuněčných společenství, při delší kultivaci ve stabilních laboratorních podmínkách (VLAMAKIS et al., 2008). Domestikace přírodních kmenů *S. cerevisiae* je charakterizována ztrátou schopnosti tvorby strukturovaných kolonií. Tento jev je provázen rovněž změnami v produkci ECM, morfologii buněk a dramatickými rozdíly v genové expresi (KUTHAN et al., 2003). Zajímalo nás, zda je možný i reverzní proces, tedy vznik fenotypu schopného produkce strukturovaných kolonií z domestikovaného kmene, který si běžně udržuje na komplexních médiích své vlastnosti a tvoří kolonie hladké.

V podmínkách dlouhodobé statické kultivace domestikovaného kmene BR-S s omezeným přísunem živin skutečně dochází k modulaci fenotypu a vzniku strukturovaných kolonií. Repertoár takových změn je širší, kdy vzniká větší množství fenotypů s odlišnou strukturou kolonie, mezi nimi ovšem rovněž kolonie na první pohled nerozeznatelné od kolonií původního přírodního kmene BR-F. Detailnější analýza takového kmene, nazvaného BR-RF, prokazuje obnovení řady vlastností, které jsou typické a nezbytné pro vznik strukturovaných kolonií (viz. kap. 5.2) jako je produkce ECM a také exprese genu *FLO11*. Na druhou stranu jsou ovšem při bližším pohledu patrné odlišnosti a to zejména ve stabilitě obou kmenů, kdy kmen BR-RF přepíná na komplexních médiích zpět na hladké varianty s frekvencí výrazně vyšší než původní kmen a rovněž v morfologii buněk ze kterých jsou obě strukturované kolonie složeny.

Vzájemné transkriptomové srovnání výše uvedených kmenů umožnilo identifikaci molekulárních faktorů, které se mohou podílet na tvorbě strukturovaných kolonií. Ve strukturovaných koloniích původního přírodního kmene BR-F a „zdivočelého“ kmene BR-RF dochází ve srovnání s hladkými koloniemi kmene BR-S ke zvýšené expresi genů, jejichž produkty se účastní syntézy a transportu sekretovaných proteinů či řada neznámých genů z velké části kódovaných v subtelomerických oblastech. V kmeni BR-S lze zaznamenat zejména zvýšenou expresi genů, jejichž produkty se účastní stresové odpovědi. Rozdíly jsou mezi oběma morfotypy, tedy strukturovaným na jedné straně a hladkým na straně druhé, rovněž patrné v expresi genů ovlivňujících složení buněčné stěny a metabolismus lipidů. Vzájemné srovnání zmíněných fenotypových změn a jejich nám rovněž umožnilo identifikaci genů, které jsou specifické pro každý ze strukturovaných fenotypů a odhalil rovněž jejich značné transkritomové odlišnosti. Nepříliš funkčně související geny specifické pro kmen BR-

RF jsou lokalizovány na poměrně úzkých chromozomálních oblastech a to dominantně na levém rameni chromozomu XV. Analýza skupiny genů specificky aktivovaných v kmeni BR-F prokazuje, že značná část těchto genů se nachází v oblastech kontrolovaných transkripčním umlčováním, kdy se tento mechanismus zprostředkovaný specifickou deacetylasou Hda1p může účastnit regulace některých fenotypových projevů původního přírodního kmene BR-F.

Výsledky jsou prezentovány v následujícím rukopisu:

Šťovíček V., Begany M., Váchová L., Palková Z. (2012): **Genetic determinants of three distinct colony variants formed by yeast phenotypic switching.** *Rukopis připravený pro odeslání k recenznímu řízení v impaktovaném časopise*.

Genetic determinants of three distinct colony variants formed by yeast phenotypic switching

Vratislav Šťovíček[1], Markéta Begany[2], Libuše Váchová[2,1] and Zdena Palková[1*]

[1]Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic

[2]Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Running title: Phenotypic switching of wild yeasts

*Corresponding author: Zdena Palková, Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic, phone: 420-221951721, fax: 420-221951724, e-mail: zdenap@natur.cuni.cz

Abbreviations: CFU, colony forming unit; ECM, extracellular matrix; HMWGP, high molecular weight glycoprotein; MW, molecular weight; 2P-CM, two-photon confocal microscopy

Keywords: biofilm colony, histone deacetylase, phenotypic switching, wild yeast strain

Abstract

***Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural settings are able to form complex biofilm colonies equipped with intricate protective mechanisms. However, these strains reprogram themselves with a certain frequency under cultivation in plentiful laboratory conditions. Resulting domesticated strains switch off some of the protective mechanisms and form smooth colonies resembling those of common laboratory strains. Here, we show that domestication is not one-way process. It can be reverted when domesticated strains are challenged by various adverse conditions and consequently results in restoration of biofilm colony formation. However, phenotypic, microscopic and transcriptome analyses showed that phenotypic transitions are complex processes that affect different aspects of yeast physiology and can lead to generation of phenotype resembling in some parameters the original wild strain and in the others its domesticated derivative. Comparing the transcriptomes of the three distinct phenotypic variants we specified genetic determinants possibly involved in formation of biofilm colony phenotype. In addition, we identified many changes occurring during the phenotypic transitions, not related to colony morphology, but in some cases affecting other properties of phenotypic strain-variants such as resistance to impact of environmental stress. We documented a role of histone deacetylase Hda1p in such resistance of the original wild strain. Altogether, our findings indicate that phenotypic modulation of wild *S. cerevisiae* strains generates phenotypic heterogeneity enabling flexible adaptation of the strains to particular environment. Part of this adaptation may be controlled by epigenetic mechanism conferred by specific histone deacetylase.**

Introduction

In natural environment microorganisms are not situated in stable and optimal growth conditions. Instead, microbial populations are often challenged by harmful external factors. Formation of complex multicellular communities such as biofilms or colonies provides the advantage for survival in the wild due to cooperative behavior of cells and formation of common protective mechanisms [1]. Beside this and general adaptive response of individual cells, phenotypic heterogeneity which allows the survival and efficient adaptation to quickly changing environment is also one of the important properties enabling populations to thrive in natural settings. So-called phenotypic switching is a mechanism how such heterogeneity may be achieved. This spontaneous process with certain frequency generates the cell phenotypes which are better adapted to particular setting and allow thus flexible reaction of the population

on environmental changes [2]. Phenotypic switching is common phenomenon observed in both prokaryotic and eukaryotic microorganisms [3,4]. In yeast, phenotypic switching randomly generates diverse array of phenotypic changes leading to emergence of colonies with altered morphology [5]. The appearance of different colonies occurs at frequencies above that of somatic mutations and the switch is often reversible. The switched variants, although relatively stable during the subsequent passages, thus retain the ability to switch back with particular frequency to the phenotype of its original ancestor [6]. In contrast to adaptive conversions of the whole population such as filamentous growth evoked by nutrient starvation [7,8], only small number of cells in population changes phenotype during the phenotypic switching, while the others retain original properties [5].

Phenotypic switching is a phenomenon observed frequently in pathogenic yeasts such as *Candida* sp. [9-11], *Cryptococcus neoformans* [12] or *Trichosporon asahii* [13] and also in clinical isolates of *S. cerevisiae* [14]. During these phenotypic transitions morphologically diverse colonies including spatially heterogeneous "wrinkled", "fuzzy" or "serrated" morphotypes are formed [3]. Phenotypic switching occurs also in site of infection and generates the phenotypes which evade effectively host immune response [15] and display also many factors contributing to increased virulence [12,16].

Although defined as a random event not necessarily induced by external factors, environmental conditions can usually affect the frequency and the "orientation" of the switch. Some strains of *C. albicans* undergo transition from "white" to "opaque" colony phenotype and vice versa [17], which represents a widely studied example of phenotypic switching system important also for mating [18]. Frequency of switching can be increased in both directions by UV light. Exposure to higher temperature above 30°C induces the frequency of switch to "white" phenotype with massive conversion of almost whole population at 37°C [17]. Thus, white cells predominate in the blood stream with physiological temperature of 37°C, while "opaque" cells more efficiently colonize the skin surface, an environment with lower temperature [16]. Anaerobic conditions and other environmental factors modulates the transition in "opaque" direction [19], revealing that switching provides mechanism of adaptation to certain niches and variety of conditions within mammalian body.

Wild *S. cerevisiae* strains isolated form their natural habitats also exhibit considerable phenotypic heterogeneity and gain the ability to switch phenotype between the two [20] or more [21] different colony morphotypes. Under laboratory conditions of cultivation on rich media, the switch is usually oriented in the direction of formation of less structured colonies [21]. Such so called "domestication" results in formation of strains that are stable during

subsequent passages on both fermentable and non-fermentable agar media and form smooth colonies that are similar to colonies formed by standard *S. cerevisiae* laboratory strains [20]. Formation of domesticated BR-S derivative of wild *S. cerevisiae* BR-F strain on non-fermentable medium occurs efficiently with average frequency about 2-3% [20] which suggests that it is caused by a regulated event rather than by some mutation. We have therefore ask a question of whether domestication event is reversible and whether BR-S strain can switch back, restore the properties of parental BR-F strain and form structured biofilm colonies similar to those formed by the wild strain. We show here that during BR-S cultivation in adverse conditions the phenotypic changes leading to the formation of structured colonies indeed occurs. However, our results also show that potential of phenotypic variability of this strain is wider and that the reverse transition of domesticated BR-S strain is more complex process. Using transcriptome comparison of original wild BR-F strain, its domesticated derivative BR-S and feral strain BR-RF restoring biofilm colony formation, we identified the expression changes involved in such transitions, specified the factors involved in formation of structured biofilm colonies and suggested that at least some of the properties of original wild strain may be under control of epigenetic mechanisms.

Results

Under starvation feral subclones of domesticated BR-S strain forming structured colonies arise

Wild *S. cerevisiae* strains form structured biofilm colonies that significantly differ in their properties from smooth colonies formed by wild strain domesticated derivatives [20]. The frequency of domestication process varies in individual strains, but it is always higher than frequency of random spontaneous mutations [21]. This finding indicates that regulatory event(s) rather than selective mutation is/are responsible for this transition and that domestication could be a reversible event. Taking to account the fact that domestication is evoked by favorable and plentiful laboratory conditions, we set up different stressful and long-term starvation conditions to induce opposite process, i.e. conversion of domesticated BR-S strain to the wild-type strain. We incubated BR-S strain several months stationary (i.e. without shaking) in different media with limited carbon source (e.g. YE-Eth medium) and, in some cases with increased concentration of salts, simulating conditions with different osmotic pressure. During the incubation, the number of colony forming units (CFU) in the suspension was monitored and, in parallel, morphology of arising microcolonies was determined on GMA plates (Fig. 1A). Reproducibly, cell culture was slowly growing until approximately

60th day, as indicated by gradually increasing number of CFU. From approximately 80th day, the CFU number started to decrease suggesting gradual dying of the part of the population (Fig 1A, line graph). Colonies with structured morphology rarely started to appear among smooth colonies between 30th and 40th day. Frequency of their appearance increased from about 60th day, being between 1-4% of CFU (Fig. 1A, bar graph). Interestingly, at later stages of cultivation (140 days), proportion of structured colonies increased up to 20% (Fig. 1A), in some parallels even to 40 % of all CFU (not shown).

The morphology of emerging structured colonies was not identical, varying from moderately structured to fully structured colony phenotype. After re-plating, we classified emerging colonies into four typical structured colony phenotype categories (Fig. 1B). Colonies of IVth category resembled the phenotype of biofilm colonies formed by the original wild BR-F strain. One BR-S subclone forming colony phenotype of this category was designated BR-RF and selected for further analyses.

BR-RF feral strain domesticates more efficiently than original wild BR-F strain

With the aim to monitor stability of BR-RF strain, we tested the frequency of its domestication evaluated as frequency of formation of smooth colonies and we compare it with that of BR-F strain growing on media with fermentable (glucose) and non-fermentable (glycerol) carbon sources. Structured BR-F and BR-RF colonies were grown on complex glucose (YEGA) and complex glycerol (GMA) plates, respectively. Colonies at different time-points of their development were taken, their cells re-plated on fresh GMA and the number of smooth colonies formed by domesticated subclones determined. In BR-F colonies, the percentage of domesticated subclones was in average from 0,05% (4-days old colonies) to 2,6% (22-days old colonies) when growing on non-fermentable medium and from 0,6% (4-days old colonies) to 7,5% (22-day old colonies) when growing on fermentable medium (Fig. 1C, upper graphs). In individual BR-F colonies the frequency of domesticated subclones varied from 0% to 15% on non-fermentable and from 0% to 24% on fermentable medium (Fig. 1C, bottom graphs). In general, the domestication rate of BR-RF strain was much higher than that of the BR-F strain in colonies grown on both media. In BR-RF colonies grown on non-fermentable GMA, domesticated subclones appeared with average frequencies from 2% (4-days old colonies) to 21% (22-days old colonies) with variation in individual colonies from 0% to 37%. Likewise BR-F domestication, also BR-RF domestication was even higher when BR-RF colonies were grown on fermentable YEGA, varying in average from 10% (4-days old colonies) to 26% (22-days old colonies) with individual colony variation from 2% to 53% of

domesticated subclones (Fig. 1C). Taken together, these data indicate higher rate of domestication events on fermentable than on non-fermentable medium in general and also suggest that although BR-RF forms colonies morphologically identical with BR-F colonies, feral BR-RF domesticates much efficiently than the original BR-F strain.

Morphology and physiology of colonies formed by feral BR-RF strain

The bird view morphology of colonies formed by BR-RF strain is identical to that of colonies formed by original BR-F strain (Fig. 2A). The analysis of internal ultrastructure using 2P-confocal microscopy confirmed that likewise BR-F colony [22], also BR-RF colony is composed of aerial part and subsurface roots attaching colony to the substratum. Colonies of both strains contain internal cell-free cavities (Fig. 2B). On the other hand, this analysis also revealed that in contrast to BR-F [22], BR-RF colonies are formed exclusively by oval cells including subsurface parts where chains of oval cells instead of pseudohyphae are invading the agar (Fig. 2B). In this aspect BR-RF strain resembles its domesticated BR-S ancestor and not original BR-F strain. Thus, although BR-RF strain gain ability to form fully structured colonies, it does not revert cell phenotype and retain oval cells typical for BR-S strain (Fig. 2D).

Decreased BR-RF stability as revealed by increased rate of BR-RF domestication as compared with BR-F, together with observed cell-shape differences indicated that although forming similarly structured colonies, BR-F and BR-RF strains could differ in some other physiological parameters (Fig. 2). We have therefore compared prominent morphological and physiological characteristics typical for colonies formed by wild versus domesticated strains [21] in BR-F, BR-RF and BR-S colonies.

As described previously [20], BR-F and BR-S colonies differ significantly in time-line of wet biomass accrual, water content (dry mass) and approximate number of cells within the colony. Monitoring the same characteristics in BR-RF colonies grown on GMA revealed that these colonies in some aspects behave as “intermediate” between BR-F and BR-S (Fig. 2). This “intermediate” behavior regards mostly biomass accrual (Fig. 2C) and colony size (Fig. 2A) (growth rate), while the water content (dry mass) of BR-RF almost resembles BR-F colonies (Fig. 2C).

Another typical feature of BR-F colony when compared with BR-S colony is presence of high molecular weight glycosylated protein (HMWGP), a possible constituent of extracellular matrix (ECM), the production of which is switched off during the domestication [20]. BR-RF colonies restored production of this protein, the level of which was however lower in BR-RF

than in BR-F colonies and also mobility slightly shifted to lower MW, which suggests lower level of its glycosylation (Fig. 3A). These data also implied that BR-RF colonies restored the ECM production. We have therefore prepared BR-RF P_{GAL1}-GFP strain and monitored presence of ECM in developing colony by 2P confocal microscopy as described [22]. Obtained data confirmed that likewise in BR-F colonies [22] also in BR-RF colonies internal colony regions are protected via low-permeable ECM (Fig. 3B).

Production of Flo11p adhesin is indispensable for formation of structured colonies [21,23] and Flo11p production is switched off during domestication [20]. Both *FLO11* gene expression (Fig. 3C) and Flo11p protein production (Fig. 2D) were recovered in feral BR-RF strain. Interestingly, the *FLO11* mRNA from BR-RF is longer than that of BR-F strain (Fig. 3C), which indicates that some *FLO11* gene arrangements occurred during phenotypic transitions of wild BR-F strain.

Expression differences in BR-F, BR-RF and BR-S colonies

Although differing in some physiological characteristics, both BR-F and BR-RF strains form structured colonies with similar morphology, harboring prominent features typical for biofilm colonies (e.g. ECM and Flo11p adhesin production). To obtain an overall view of the transcription characteristics typical for biofilm colony morphotype, we isolated transcriptomes of 4- and 7-days old colonies formed by BR-F, BR-S and BR-RF strains. We then compared transcriptomes of BR-RF versus BR-F, BR-RF versus BR-S and BR-F versus BR-S using the microarray technique. The mutual comparison of the obtained gene sets allowed identification of genes specifically activated or repressed in complex biofilm colonies (represented by BR-F and BR-RF strains) when compared with smooth colonies (represented by BR-S strain) (Fig. 4, Table 1). However, these expression differences possibly related to biofilm colony phenotype were only part of observed expression differences between colonies of particular strains. Other, probably colony phenotype unrelated differences were observed between BR-RF and BR-F colonies as well as between BR-RF and BR-S colonies. Some of these differences are summarized in Fig. 4 and discussed below.

Expression characteristics of complex biofilm colonies

The comparison of structured colony transcriptomes and smooth colony transcriptomes revealed 86 and 105 genes with significantly higher expression in 4- and 7-days old structured colonies, respectively, with 31 genes common to both time points. Smooth colonies increased expression of 75 and 173 genes in 4- and 7-days old colonies, respectively, with 39 genes common to both time points (Table 1, Fig. 4). Despite differences in individual genes, the

main “structured” and “smooth” expression categories remained the same on days 4 and 7 (Table 1).

Structured biofilm colonies upregulated genes involved in protein secretion and modification (9 genes). Some of these genes, such as *MNN9* for the ER-localized subunit of Golgi mannosyltransferase complex that mediates elongation of the polysaccharide mannan backbone, *CWH41* for ER-localized processing α-glucosidase I involved in assembly of cell wall β-1,6 glucan and asparagine-linked protein glycosylation, and genes *BST1* and *PER1* involved in GPI-anchor remodeling, can influence structure of the cell wall and/or the membrane. In addition, structured colonies upregulated several cell wall localized genes (5 genes) such as *BSC1* with similarity to *FLO11* coding for Flo11p adhesin important for structured colony formation [21] and *ASP3* genes for cell wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism. On the other hand, structured colonies down regulate expression of some other cell wall related genes (8 genes) such as *SPS100* and *PFS1* involved in sporulation, *CTS1* for endochitinase required for cell separation after mitosis and *BGL2* for endo-β-1,3-glucanase, as well as secretion and protein modification related genes (8 genes) including *GYP7* involved in vesicle transport, *KTR4* in protein glycosylation and *RCR1* in cell wall chitin deposition. These data indicate that structured and smooth colonies differ in composition of cell wall carbohydrate structure and protein composition and modification. Structured and smooth colonies differed also in expression of metabolism related genes and nutrient transporters. Structured colonies upregulated several amino acid metabolic genes (8 genes) and transporters (4 genes) including genes involved in arginine and methionine metabolism, *CAN1* for arginine uptake and *VBA3* for basic amino acid transport in vacuole. Structured colonies also upregulated vitamine metabolic genes (3 genes) and *VHT1* for high-affinity plasma membrane H^+-biotin symporter. In addition, structured colonies expressed also genes involved in lipid metabolism and fatty acid β-oxidation (7 genes) and inositol transporter gene *ITR1*. In contrast, few amino acid metabolic genes upregulated in smooth colonies (4 genes) comprise genes for mitochondrial glycine decarboxylase complex. Smooth colonies also upregulated number of nucleotide metabolism related genes (7 genes), genes involved in copper and iron resistance and homeostasis (4 genes) and several lipid metabolism related genes including those involved in ergosterol (*ERG3*, *ERG4*), sphingolipid and ceramide (*SUR1*, *SUR4*, *CSG2*) metabolism. Expressed genes for transporters include those for transport of hexoses (*HXT* genes, *MAL11*) and phosphate (*PHO84*, *PHO87*).

In addition, smooth colonies upregulated large group of genes related to stress response (32 genes) including genes for different chaperones (15 genes), genes involved in cell-wall stress response/maintenance (5 genes) and some genes involved in oxidative stress response such as *GPX1* for phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and *TRX3* for mitochondrial thioredoxin. Few stress-response genes induced in structured colonies (9 genes) include oxidative stress response genes (*GRX3*, *TSA1*, *TSA2*, *CTA1* and *SOD2*) and genes involved in DNA damage response and repair (*DDR48*, *YBL036C*, *DDI3* and *RAD10*).

Cells of structured and smooth colonies also differ in expression of a remarkable number of different signaling cascade components (3 genes upregulated in structured and 12 genes in smooth colonies), transcription regulators (5 genes upregulated in structured and 17 genes in smooth colonies), and genes involved in translation and RNA processing (10 genes upregulated in structured and 14 genes in smooth colonies) (Table 1). Transcription factor genes upregulated in structured colonies include *TEC1* and *SFG1* involved in yeast filamentation and pseudohyphal growth, while those expressed in smooth colonies include *RLM1*, *YFL052W* and *USV1* related to cell wall integrity and several genes related to chromatin structure and remodeling (*TOS8*, *TOD6*, *TMA23*, *HIR2* and *HHT1*).

In addition, structured colonies predominantly expressed genes for transposons and large group of genes with unknown function, some of which localize to subtelomeric regions.

Feral BR-RF colonies upregulated expression of genes located at specific positions in chromosomes

In addition to expression of typical "biofilm colony" genes, BR-RF colonies increased expression of 265 and 524 (genes in 4- and 7-days old colonies, respectively), when compared with BR-F with 182 genes common to both time-points. Repressed BR-RF genes versus BR-F comprise 265 and 525 genes in 4- and 7-days old colonies, respectively, with 184 genes common to both time-points. As to the BR-RF and BR-S comparison, BR-RF increase expression of 284 and 483 genes in 4- and 7-days old colonies, respectively, with 132 genes common to both time-points, and it represses expression of 232 and 489 genes in 4- and 7-days old colonies, respectively, with 123 genes common to both time-points. Relatively large number of genes was specifically upregulated (106 genes in 4 days old and 197 genes in 7 days old colonies) and downregulated (61 genes in 4 days old and 179 genes in 7 days old colonies) in BR-RF when compared with both BR-F and BR-S (Fig. 4).

Interestingly, Positional Gene Enrichment analysis (PGE) revealed that large number of gene expression differences between BR-RF and either BR-F or BR-S or both, regard

expression of genes localized in specific chromosomal positions (Fig. 5) rather than genes randomly distributed in the genome. Most prominently, high number of genes upregulated in BR-RF localize to the 300 Kbp long region of the left arm of chromosome XV. It is, in particular, 34% of all activated genes in BR-RF versus BR-S, 30% of all activated genes in BR-RF versus BR-F and 60% of all activated genes in BR-RF versus both BR-S and BR-F. Smaller groups of genes upregulated in BR-RF versus either BR-S or BR-F localize to 320 kbp region of chromosome IX (Fig. 5A) and group of BR-RF down-regulated genes versus BR-F and BR-S localizes to the 240 kbp region of chromosome XII (Fig. 5B). In contrast, neither gene expression differences between BR-F and BR-S, nor expression typical for biofilm colonies (i.e. expression differences between BR-F and BR-RF versus BR-S) are localized to specific chromosomal position.

BR-F colonies upregulate expression of genes located in HAST domains that affect BR-F resistance

Some expression characteristics of colonies of different phenotypes suggest also differences in metabolism (e.g. amino acid and carbon metabolism). However, most of the involved genes include those that are related to age dependent colony changes described previously [24]. These expression differences thus probably reflect slightly different growth rate of individual strains (see above) than being other colony phenotype related characteristics.

Beside that, cursory glance at the list of differently expressed genes revealed that some of them are localized close to telomers. Taking to account the hypothesis that transitions among different phenotypes during phenotypic switching could be controlled by transcriptional silencing mechanisms performed by specific chromatin remodeling enzymes [25,26], we have performed comparison of genes differently expressed in BR-F, BR-S and BR-RF colonies with databases of genes under the control of different deacetylases causing transcriptional repression in often specifically localized subtelomerical chromosomal regions. Such analyses revealed correlation between genes localized to so-called HAST domains, regions controlled by Hda1p histone deacetylase [27], and genes upregulated in BR-F colonies. In particular, 17% of genes upregulated in BR-F versus BR-S, 20% of genes upregulated in BR-F versus BR-RF and 31% of genes upregulated in BR-F versus both BR-F and BR-S 4-days old colonies localize to these domains. In contrast, upregulation of HAST domain genes in BR-S and BR-RF versus BR-F was mostly below 8% (Fig. 6A). Binding and histone deacetylation by Hda1p suggests that HAST domain genes are repressed. Upregulation of such genes in

BR-F colonies thus indicates decreased activity of Hda1p in BR-F colonies as compared with BR-S and BR-RF colonies.

HAST domain genes upregulated specifically in BR-F (Fig. 6B) include genes coding for different glucosidases (8 genes) proteins with mostly unknown function with predicted localization to the cell wall (11 genes) and various transporters (9 genes). On the other hand, almost none of these HAST domains genes belong among biofilm colony expressed genes (i.e. the genes upregulated in BR-F & BR-RF versus BR-S). These data indicate that cells of BR-F colonies harbor specific properties of their envelope (both cell wall and the membrane) as compared with both BR-S and BR-RF colonies, but these properties seem not to be related to biofilm colony phenotype. To test this prediction, we prepared strain BR-S-*hda1* with deleted *HDA1* gene that should presumably derepress HAST domain genes and we analyzed its colony morphology and resistance to various stresses as compared with BR-F, BR-RF and BR-S strains (Fig. 6C). BR-S-*hda1* strain formed smooth colonies that were smooth and only slightly larger than colonies of BR-S strain of the same age (Fig. 6C). BR-F strain is significantly more resistant to chitin binding dye calcofluor and it grows better in higher temperature (37°C) than both BR-S and BR-RF strains. Deletion of *HDA1* gene in BR-S increased its calcofluor and temperature resistance that become at the same level as in BR-F (Fig. 6C). These data supported our prediction that HAST domain gene products do not affect colony morphology, but they significantly affect BR-F cell surface properties and thus its resistance to the environment.

Discussion

In addition to domestication process that occurs when wild *S. cerevisiae* strains are transferred to favorable laboratory conditions [20,21], we showed that domesticated BR-S strain can switch back to the wild-type-like phenotype and form structured biofilm colonies after very long-term stay under starvation conditions. In contrast to original BR-F strain that forms highly structured colonies with uniform morphology, feral BR-S subclones formed spectrum of different colony phenotypes including those that were fully structured such as colonies formed by feral BR-RF strain resembling the original BR-F colonies. In addition, several intermediate BR-S colony phenotypes varying between smooth and structured have been also isolated. These data agrees with previous findings that different unrelated *S. cerevisiae* strains (i.e. the strains isolated independently from various habitats) can form differently structured colonies. One strain can even create several colony phenotypes in some

of the cases [21] similarly to the phenotypic transitions in pathogenic fungi, which also involve several different colony phenotypes [3]. Interestingly, such phenotypic variability was induced by long-term starvation even in BR-F strain that originally exhibited only two phenotypic variants – highly structured wild colonies and smooth domesticated colonies. During the BR-S strain growth under nutrient restricted conditions, first feral subclones started to appear after approximately 30 days of the cultivation, varying between 1-5 % of colony forming units until about 130 days of the cultivation, i.e. the time when the population started to die rapidly. Later, the survivals in the population comprise 15-40 % of cells that formed differently structured colonies. This finding suggests that feral subclones gained better ability to survive starvation than domesticated cells supporting thus the prediction of environmental effect on strain behavior and stability. Similarly, various stress factors have been shown to promote phenotypic switching of *C. albicans* resulting in production of cell variants more resistant to stresses [28]. Furthermore, exposure of *C. neoformans* cells to defense mechanisms within the mammalian body also leads to modulation of phenotype of originally homogenous population and subsequent prevalence of variants more resistant to host immune response [15].

Feral strain BR-RF forms structured colonies with bird view morphology identical to original BR-F colonies. This feral strain, however, differed in several aspects from wild BR-F strain. Firstly, it domesticated 4 to 8 times more effectively on both fermentable and non-fermentable media, respectively, than BR-F strain. Presence of glucose efficiently promotes switching to smooth variant in both BR-F and BR-RF colonies. Fermentable carbon source also causes transient change to less structured colony morphology [29], supporting inhibitory function of rich nutrient conditions in biofilm colony formation and its inductive potential in switching to smooth colonies during domestication. Also the other feral subclones quickly switch back to the domesticated phenotype when grown on complex media (not shown). This suggests that although the several months of starvation induced formation of feral subclones, such treatment was not sufficient enough to stabilize the feral subclones similarly as original BR-F has been stabilized under natural settings. In addition, formation of different types of feral strains as well as differences observed in BR-RF and BR-F strains imply that different processes of phenotypic variation occur under starvation. Secondly, colonies of feral BR-RF strain differ in some physiological parameters, such as water content and growth efficiency, from colonies of both related strains, being an intermediate between BR-F and BR-S colonies. Likewise, BR-RF strain still forms oval cells and not elongated cells and pseudohyphae typical for BR-F, supporting the idea that cell morphology is not a key factor indispensable

for formation of biofilm colony architecture [21]. On the other hand, both formation of ECM and production of Flo11p adhesin, i.e. the traits essential for the formation of structured colony morphology [21] have been recovered in BR-RF strain colonies. Interestingly, length of *FLO11* transcript differs between original wild BR-F and feral BR-RF strain. Recombination of central repeat domain of genes encoding yeast adhesins which often leads to generation of longer protein with different and even enhanced adhesive function [30] can be frequently observed [31]. However, change in *FLO11* gene happened probably already during the domestication process, since the *FLO11* transcript, although observed at very low level in BR-S colonies, has the same size in the case of BR-S and BR-RF. Thus, it seems that more than actual gene and potentially protein size, its expression level is important in context of biofilm colony formation. In addition, this finding together with different MW of the protein component of ECM, which could be caused by different posttranslational modifications, but also possibly by changes at gene level, reveals that DNA recombination events may occur frequently during the phenotypic transitions of wild BR-F strain. Thirdly, mutual expression comparison of colonies of the three strains (BR-F, BR-S and BR-RF) clearly showed that colonies of feral BR-RF differ in expression from both BR-F and BR-S. Altogether, these data showed, that BR-RF strain selected under conditions of long-term nutrient deprivation gain some properties of BR-F (e.g. formation of structured biofilm colony morphology) and keep some others of BR-S (e.g. formation of oval cells).

Transcriptome comparison of colonies of the three strains also allowed us to determine gene expression profile typical for structured colony phenotype as compared with smooth phenotype. Biofilm colonies both upregulate and downregulate distinct genes involved in cell wall remodeling as well as in delivery and modification of secreted and cell wall/membrane attached proteins. This finding indicate that in addition to Flo11p adhesin, cell wall backbone carbohydrate composition and other specific protein appearance and/or protein glycosylation could contribute to specific properties of cells, production of ECM and formation of biofilm colony morphology. Expression of transposone genes as well as several unknown genes located in subtelomeric regions in biofilm colonies suggests that different regions of the genome can be activated in biofilm than in the smooth colonies, resulting in expression of genes that are unessential for development of laboratory and domesticated strains. In this respect, finding that smooth colonies upregulated expression of group of genes involved in histone modification and chromatin remodeling could be important. Smooth colonies also upregulate significant amount of genes involved in response to various stressors. One could speculate that upregulation of such genes is general response typical for smooth colonies that

did not yet fully reached the phase when adaptive stress-releasing mechanisms are activated [24] and lack sophisticated protective mechanisms such as ECM production that are functional in young biofilm colonies [22]

Importance of chromatin remodeling in phenotypic switching is supported also by observation that BR-F colonies, but not BR-RF colonies, seem to express genes located to HAST domains, i.e. to the regions in the genome, the expression of which is modulated by histone deacetylase Hda1p [27]. Derepression of these genes does not affect smooth colony morphology of BR-S-*hda1* colonies, which means that HAST domain BR-F expressed genes are unrelated to biofilm colony morphotype. Interestingly, one of the mechanisms of *FLO11* expression regulation (i.e. regulation that is very complicated and affected by various factors) that seems not to be relevant to formation of structured biofilm colonies was ascribed to Hda1p [32]. On the other hand, deletion of *HDA1* and thus the derepression of HAST domain genes significantly increased BR-F cell resistance to the cell wall binding dye calcofluor and to the high temperature as compared with both BR-S and BR-RF. Calcofluor interferes with assembly of cell wall [33] and several mutants affecting cell wall exhibiting increased sensitivity to calcofluor dye can be observed [34] suggesting that the resistance of original BR-F strain can be indeed caused by expression of HAST domain genes encoding various cell surface-related proteins. In this respect, cells from feral BR-RF colonies behaved as BR-S cells, which agrees with the observation that HAST domain genes were not derepressed in BR-RF strain. In contrast to our results, role of specific deacetylases with important role of Hda1p in controlling of "white-opaque" colony phenotypic transition has been also demonstrated [25,35]. This reveals on one side that epigenetic mechanisms mediated by chromatin remodeling enzymes have the capacity of phenotypic heterogeneity regulation and that some of the phenotypic properties of original wild BR-F strain may be conferred by turning off the transcriptional silencing mechanism. On the other side, however, the data indicate that different colony phenotypic switching in different yeasts is controlled by different pathways and very probably even by multiple pathways in particular yeast genera. In addition to biofilm colony specific expression characteristics, expression in BR-RF colonies seem to be related to 3 specific regions of their genome. 80% (in case of 4-days old colonies) of genes upregulated exclusively in BR-RF is located in either chromosome XV or chromosome IX. 46% of specific BR-RF down regulated genes locates to the chromosome XII. These data indicate that some chromosome rearrangements could occur during feral BR-RF strain selection that either resulted in duplication of some parts of the chromosomes or, more probably, to their rearrangement to some more actively transcribed genome regions.

These chromosome site specific expression characteristics of BR-RF have nothing to do with structured colony phenotype as only few biofilm colony specific genes localize to these chromosomal regions. DNA rearrangement events leading even to karyotypic instability have been observed also during the transitions of certain *C. albicans* [9] and *C. neoformans* strains [12]. Likewise in BR-RF, also these previously observed changes were not consistently correlated with phenotypic variability and were irreversible. Thus, it seems that DNA rearrangements resulting possibly in particular expression changes are not the cause of the phenotypic switch, they could be rather side-product of increased rate of recombination events occurring during the phenotype transitions.

Obtained data clearly indicate wide variability of natural *S. cerevisiae* strains, which can be even more potentiated under variable environmental conditions. Observed phenotypic and expression differences between the three strains provide some clues on processes specific for biofilm colony formation. In addition, they also document that simple comparison of the two, even originally isogenic strains, such as wild BR-F and domesticated BR-S reveals many significant gene expression and phenotypic differences, but only few of those seem to be related to formation of biofilm colonies.

Materials and Methods

Strains and media

Wild *S. cerevisiae* strain BR-F is from the collection of the Chemical Institute of the Academy of Science, Bratislava, Slovak Republic. BR-RF and BR-S strains are isogenic to BR-F strain and arose by phenotypic switch. All other strains were prepared from the strains mentioned above and are listed in Supplemental table 1. Colonies were grown on GMA (3% glycerol, 1% yeast extract, 2% agar) or YEGA (2% glucose, 1% yeast extract, 2% agar) media at 28ºC unless otherwise indicated. For stationary cultivation liquid YE-Eth (1% yeast extract, 2% ethanol) in special cases supplemented with different concentration of salts was used. For selective plates, media were supplemented with 200 mg/l G418 (Duchefa Biochemie, The Netherlands) or 100 mg/l nourseothricin (Werner Bioagents, Germany).

Fluorescence microscopy of cells and colony imaging

Cells were examined under a Leica DMR microscope equipped with a 100x/1.3 oil objective and a GFP filter or Nomarski contrast and then photographed with a ProgRes® MF^{cool} CCD camera (Jenoptik, Germany). Colony images were captured in incident light. ProgRes® CT3

CMOS camera with a Navitar objective, Fiber-Lite PL-800 illumination system and NIS Elements software (Laboratory Imaging) were used.

Determination of colony biomass

To avoid colony size fluctuations caused by neighboring colonies in high density plating, cells were plated in the concentration of approximately 100-120 and 40-50 per plate for 4 and 7 days old colonies, respectively. Colony diameter was determined using the NIS Elements software. The biomass of colonies was estimated as their wet weight. To determine dry biomass, the wet biomass was dried on Speed-vac for at least 6 hrs. Water content was calculated as the difference between wet and dry biomass. Presented data is the average of three independent experiments (several parallels in each) ± SD (standard deviation),

Determination of switching frequency

The occurrence of switching from the BR-F and BR-RF to the BR-S colony type was determined by visually scoring the colonies derived from structured biofilm colonies of different age growing either on GMA or YEGA media. For calculation of switching frequencies, 100-200 BR-F and BR-RF cells were plated on GMA plates, and at least 5000 colonies were scored. The percentage of colonies of the total CFU with smooth morphology relative to those with fluffy morphology was determined.

Construction of the strains

Flo11p-GFP strains containing the *FLO11* gene fused with the GFP gene in their genome were constructed via previously described procedure [23]. Gene knock-outs were performed by transforming the cells with deletion cassettes generated by PCR using the primers and plasmids listed in Supplemental table 2. Yeast cells were transformed according to [36]

Sensitivity of the strains to Calcofluor White

Sensitivity of particular strains was tested by drop assay. 4-days old colonies were harvested to make a suspension containing $2x10^8$ cells per ml. 5 µl drops of 10-fold serial dilutions were applied to GMA plates supplemented with 10 mg/l or 200 mg/l of calcofluor white (Sigma Aldrich). Plates were scored after 3 days of incubation at 28ºC or 37ºC.

Northern analysis

Biomass from colonies growing on GM plates was resuspended in TES (10mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA, 0.5% SDS) buffer. Approximately 200 mg biomass of BR-F, BR-RF and 100 mg of BR-S colonies were used for one isolation procedure. Total RNA from the cells was

isolated by hot phenol method. Concentration of obtained samples was measured on spectrophotometer. The samples were then diluted in mixture of water and formamide (3:10) to a final concentration of 2 μg/μl. 6 μl of each sample were denatured for 10 min at 65°C and loaded on 1.5% agarose gel. RNA molecules were transferred to positively charged nitrocellulose membrane (Hybond-XL, Amersham Bioscience) overnight in 20x SSC buffer. The membrane was then exposed to a certain labeled probe overnight at 65°C. Radioactive signal was visualized on Fuji X-ray film. DNA probe for the *RDN18* gene is complete ORF of the gene prepared by PCR reaction. For the *FLO11* probe, a PCR fragment corresponding to the last 1382 bp of the *FLO11* gene was used. The [α-^{32}P] dCTP labeled probes were obtained by random priming using the DecaPrime II Kit (Ambion).

Microarray analysis

mRNA was isolated from 800 μg of total RNA using a Micro-Fast track 2.0 Kit (Invitrogen). Reverse transcription was performed for 3h at 42°C from 2-4 μg of mRNA with 5 μg of random hexamers (Roche), 2 μg of Oligo(dT) (Invitrogen), 33 μM dUTP-Cy3 or dUTP-Cy5 (GE Healthcare), 500 μM dATP, dCTP and dGTP, 250 μM dTTP (Roche) and 600 U of Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). After reverse transcription, RNA was hydrolyzed with 0.1 N NaOH for 10 min at 70°C, the two reactions (Cy3 and Cy5) were pooled and unincorporated nucleotides removed by ethanol precipitation followed by purification in a Quiaquick column (Quiagen). 30 μl of labelled cDNA was mixed with 50 μl of hybridization solution (100 μL of DIG Easy Hyb solution (Roche), 5 μL of yeast tRNA (10 mg/ml, Invitrogen) and 5 μL of calf thymus DNA (10 mg/ml, Sigma)), incubated at 65ºC for 2 min and then cooled to room temperature. The mixture was then applied to Yeast 6.4K Array (Y6.4K) double spotted ORF slides (University Health network, Toronto, Canada) and incubated overnight at 37ºC. The arrays were washed according to the manufacturer's protocol and scanned using Axon fluorescent scanner and Genepix software. Three double-genome microarrays (biological replicates) were used. Spots were detected using TIGR Spotfinder (TM4.org) software and normalized in TIGR MIDAS (TM4.org) using the LOWESS method. Differentially expressed genes were selected using a combined fold change and t-test p-value cut-off criterion. Genes showing at least 1.5-fold change ($\log_2$>0.585) in their average expression and simultaneously a p-value<0.05 were considered to be differentially expressed.

Extracellular material extraction, SDS–PAGE and detection of protein glycosylation

The biomass of whole colonies was collected, mixed thoroughly and centrifuged (15 min, 4ºC, 18 000g) to remove cells. The extracellular aqueous phase was treated with acetone for 2

h (four volumes of acetone per one sample volume) at -20ºC. The precipitate containing the proteins was suspended in a denaturing sample buffer (1 μl of the sample buffer per extract from a biomass corresponding to 2 mg of dry biomass), denatured for 15 min at room temperature and separated on 7,5% SDS–PAGE. SDS–PAGE separated proteins were transferred to a PVDF membrane and glycoproteins were visualized by sequential incubation in concanavalin A, horseradish peroxidase and chloronaphthol–H_2O_2 solution as described previously [37].

Two-photon confocal microscopy

Vertical transverse cross-sections of colonies were prepared and their side views obtained by 2P-CM as described by [38]. The cross-sections were stained with ConA-AF (concanavalin A conjugated with AlexaFluor 488; 30 μg/ml). Alternatively, GFP fluorescence was monitored. Images were acquired with a Leica TCS SP2 AOBS MP confocal laser scanning microscope fitted with a mode-locked Ti:Sapphire Chameleon Ultra laser (Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA) for two-photon excitation and using 20x/0.70 and 63x/1.20 water immersion plan apochromat objectives. Excitation wavelengths of 920 nm were used for ConA-AF and GFP and emission bandwidths were set to 470–540 nm for ConA and 480–595 nm for GFP. An overview of the morphology of colonies and individual cells was obtained simultaneously with green fluorescence as autofluorescence in the 600–740 nm wavelength range.

In silico analysis of gene sets obtained by microarray comparison

Comparison of gene sets and their overlaps with HAST domain gene list was performed using *Venny* online tool available on http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html [39]. Genes were classified into the functional categories using particular gene description in genome database available on http://www.yeastgenome.org/. Enrichment of gene sets on particular chromosomal regions was determined by Positional gene enrichment (PGE) analysis using the tool available on http://homes.esat.kuleuven.be/~bioiuser/pge [40].

Acknowledgements

We thank A. Pokorná for excellent technical assistance. This study was supported by Grant Agency of the Czech Republic 204/08/0718, Ministry of Education MSM0021620858, Charles University in Prague (UNCE 204013 and SVV-2012-265202) and RVO 61388971.

References

1. Palková Z (2004) Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. EMBO Rep 5: 470-476.
2. van der Woude MW (2006) Re-examining the role and random nature of phase variation. FEMS Microbiol Lett 254: 190-197.
3. Jain N, Hasan F, Fries BC (2008) Phenotypic Switching in Fungi. Curr Fungal Infect Rep 2: 180-188.
4. Sousa AM, Machado I, Pereira MO (2011) Phenotypic switching: an opportunity to bacteria thrive. In: Mendez-Vilas A, editor. Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Badajaz, Spain: Formatex Research Center. pp. 252-262.
5. Soll DR (1992) High-frequency switching in Candida albicans. Clin Microbiol Rev 5: 183-203.
6. Soll DR (2002) Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta Trop 81: 101-110.
7. Gancedo JM (2001) Control of pseudohyphae formation in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol Rev 25: 107-123.
8. Sudbery P, Gow N, Berman J (2004) The distinct morphogenic states of Candida albicans. Trends Microbiol 12: 317-324.
9. Slutsky B, Buffo J, Soll DR (1985) High-frequency switching of colony morphology in Candida albicans. Science 230: 666-669.
10. Lachke SA, Joly S, Daniels K, Soll DR (2002) Phenotypic switching and filamentation in Candida glabrata. Microbiology 148: 2661-2674.
11. Laffey SF, Butler G (2005) Phenotype switching affects biofilm formation by Candida parapsilosis. Microbiology 151: 1073-1081.
12. Goldman DL, Fries BC, Franzot SP, Montella L, Casadevall A (1998) Phenotypic switching in the human pathogenic fungus Cryptococcus neoformans is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 14967-14972.
13. Ichikawa T, Sugita T, Wang L, Yokoyama K, Nishimura K, et al. (2004) Phenotypic switching and beta-N-acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast Trichosporon asahii. Microbiol Immunol 48: 237-242.
14. Clemons KV, Hanson LC, Stevens DA (1996) Colony phenotype switching in clinical and non-clinical isolates of Saccharomyces cerevisiae. J Med Vet Mycol 34: 259-264.
15. Fries BC, Taborda CP, Serfass E, Casadevall A (2001) Phenotypic switching of Cryptococcus neoformans occurs in vivo and influences the outcome of infection. J Clin Invest 108: 1639-1648.

16. Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K, McCoy J, et al. (1999) Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of Candida albicans confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. Infect Immun 67: 6652-6662.

17. Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, et al. (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in Candida albicans. J Bacteriol 169: 189-197.

18. Miller MG, Johnson AD (2002) White-opaque switching in Candida albicans is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. Cell 110: 293-302.

19. Ramirez-Zavala B, Reuss O, Park YN, Ohlsen K, Morschhauser J (2008) Environmental induction of white-opaque switching in Candida albicans. PLoS Pathog 4: e1000089.

20. Kuthan M, Devaux F, Janderová B, Slaninová I, Jacq C, et al. (2003) Domestication of wild Saccharomyces cerevisiae is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. Mol Microbiol 47: 745-754.

21. Šťovíček V, Váchová L, Kuthan M, Palková Z (2010) General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. Fungal Genet Biol 47: 1012-1022.

22. Váchová L, Šťovíček V, Hlaváček O, Chernyavskiy O, Štěpánek L, et al. (2011) Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. J Cell Biol 194: 679-687.

23. Vopálenská I, Šťovíček V, Janderová B, Váchová L, Palková Z (2010) Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. Environ Microbiol 12: 264-277.

24. Palková Z, Devaux F, Řičicová M, Mináriková L, Le Crom S, et al. (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. Mol Biol Cell 13: 3901-3914.

25. Srikantha T, Tsai L, Daniels K, Klar AJ, Soll DR (2001) The histone deacetylase genes HDA1 and RPD3 play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in Candida albicans. J Bacteriol 183: 4614-4625.

26. Perez-Martin J, Uria JA, Johnson AD (1999) Phenotypic switching in Candida albicans is controlled by a SIR2 gene. EMBO J 18: 2580-2592.

27. Robyr D, Suka Y, Xenarios I, Kurdistani SK, Wang A, et al. (2002) Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. Cell 109: 437-446.

28. Alby K, Bennett RJ (2009) Stress-induced phenotypic switching in Candida albicans. Mol Biol Cell 20: 3178-3191.

29. Granek JA, Magwene PM (2010) Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. PLoS Genet 6: e1000823.

30. Fidalgo M, Barrales RR, Jimenez J (2008) Coding repeat instability in the FLO11 gene of Saccharomyces yeasts. Yeast 25: 879-889.

31. Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR (2004) Origins of variation in the fungal cell surface. Nat Rev Microbiol 2: 533-540.

32. Halme A, Bumgarner S, Styles C, Fink GR (2004) Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. Cell 116: 405-415.

33. Roncero C, Duran A (1985) Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. J Bacteriol 163: 1180-1185.

34. Ram AF, Wolters A, Ten Hoopen R, Klis FM (1994) A new approach for isolating cell wall mutants in Saccharomyces cerevisiae by screening for hypersensitivity to calcofluor white. Yeast 10: 1019-1030.

35. Klar AJ, Srikantha T, Soll DR (2001) A histone deacetylation inhibitor and mutant promote colony-type switching of the human pathogen Candida albicans. Genetics 158: 919-924.

36. Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods Enzymol 350: 87-96.

37. Hawkes R (1982) Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate--gel electrophoresis and protein blotting. Anal Biochem 123: 143-146.

38. Váchová L, Chernyavskiy O, Strachotová D, Bianchini P, Burdíková Z, et al. (2009) Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. Environ Microbiol 11: 1866-1877.

39. Oliveros JC (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.

40. De Preter K, Barriot R, Speleman F, Vandesompele J, Moreau Y (2008) Positional gene enrichment analysis of gene sets for high-resolution identification of overrepresented chromosomal regions. Nucleic Acids Res 36: e43.

Figure legends

Figure 1. **Origination and stability of BR-RF strain**. A) Line graph (left *y* axis) represents total CFU per ml of BR-S strain grown in static culture at indicated time period. Bar graph (right *y* axis) shows representation of colonies with structured morphology relative to total CFU of BR-S strain at indicated time of cultivation. B) Morphology of colonies with structured morphology originated from domesticated BR-S strain during the cultivation in static culture. From the left, morphotype I, II, III and IV (named BR-RF), bar 1 mm. C) Representation of domestication frequency of the colonies of BR-F and BR-RF strains grown on complex solid media with glycerol (GMA) and glucose (YEGA) as a carbon source. Upper graphs represent average appearance of smooth colonies after re-plating of BR-F (white columns) and BR-RF (grey columns) colonies relative to total CFU of all re-plated colonies. Bottom graphs show the switching frequencies of individual colonies.

Figure 2. **Morphology, ultrastructure, Flo11p production and physiological properties of colonies of BR-RF strain and its ancestors**. A) Fluffy colonies of original wild *S. cerevisiae* BR-F strain, fluffy colonies of feral BR-RF strain and smooth colonies of domesticated BR-S strain, bar 1 mm. B) Vertical transverse cross-section of 84 hrs old BR-RF colony stained by ConA-AF visualized by 2P-CM, bar 100 μm. At the bottom, magnification of upper aerial (left) and lower subsurface (right) part of the BR-RF colony, bar 10 μm. C) Physiological characteristics of BR-F (black columns), BR-RF (grey columns) and BR-S (white columns) colonies. Left, graph representing amount of wet biomass per colony. Right, graph representing relative amount of dry mass. D) Localization of Flo11p-GFP and morphology of cells taken from 4-days old BR-F and BR-RF colonies. Rightmost, Nomarski contrast image of cells from 4-days old BR-S colonies. The Flo11p production in these colonies is below the detection level, bar 5 μm.

Figure 3. **Visualization of ECM and its protein component and *FLO11* expression in BR-RF colonies.** A) Visualization of sugar moiety linked to the glycoproteins in extracts from BR-F, BR-S and BR-RF colonies separated on SDS-PAGE gel, arrow shows HMWGP. B) Visualization of ECM in BR-RF P_{GAL1}-GFP colonies using 2P-CM. Vertical colony cross section. Green, GFP fluorescence marks areas in which the inducer reached the cells; red, autofluorescence of all colony cells visible in areas where ECM prevented the inducer from accessing the cells. Intact colonies were induced from the bottom by placing them for 5 h on

agar soaked with 2% galactose, bar 100 μm. C) Expression of *FLO11* gene in 4- and 7-days old BR-F, BR-RF and BR-S colonies. On the right, stronger exposition is used to show low *FLO11* level in BR-S colonies, discontinuous line compares length of *FLO11* transcript in BR-RF and BR-S cells. *RDN18* gene was used as a loading RNA control.

Figure 4. **Trancriptome comparison of cells forming BR-F, BR-RF and BR-S colonies**. A) Diagrams represent number of genes in datasets obtained from transcriptome comparison of BR-F, BR-RF and BR-S colonies. The amount of genes activated in certain strain background is indicated in appropriate color (i.e. blue for genes activated in BR-F, red for genes activated in BR-RF, yellow for genes activated in BR-S). Mutual comparison of all three transcriptomes (overlap of the two transcriptome gene datasets compared to remaining one) is represented in intersection of all diagrams as indicated in the picture (i.e. black – number of genes activated/repressed in both BR-F and BR-RF compared to BR-S, violet – number of genes activated/repressed in both BR-F and BR-S compared to BR-RF, green – number of genes activated/repressed in both BR-S and BR-RF compared to BR-F).

Figure 5. **Positional gene enrichment analysis of the genes upregulated in colonies of the BR-RF strain**. A) The images represent genes activated in 4- and 7-days old colonies of BR-RF compared to BR-F (red bar), BR-S (blue bar) and both BR-F and BR-S (green bar) enriched in illustrated chromosomal regions, percentage of gene enrichment on distinct chromosomal region is shown on upper scale bar. Approximate length (in kbp) of the chromosomal regions is indicated. Representation of genes enriched in distinct chromosomal regions relative to all differently expressed genes in certain datasets is indicated in an appropriate color as "% of all activated genes". B) The same layout as described above with the genes repressed in 4- and 7-days old colonies of BR-RF compared to BR-F (red bar), BR-S (blue bar) and both BR-F and BR-S (green bar).

Figure 6. **HAST domains and *HDA1* derepression in BR-F colonies**. A) Percentage of genes localized in HAST domains relative to all genes in certain gene set compared as described in Fig. 4. B) Table of genes localized in HAST domains [27] upregulated specifically in 4- and 7-days old BR-F colonies compared to both BR-RF and BR-S colonies. Genes differently expressed only 4^{th} day are in standard letters, genes differently expressed in both 4^{th} and 7^{th} day are in bold and genes differently expressed only 7^{th} day are italicized. B) Left, drop assay of cells from BR-F, BR-RF, BR-S and BR-S *hda1* colonies on GMA and

calcofluor supplemented plates grown at 28ºC and 37ºC as indicated. Right, 6-days old colonies of BR-F, BR-S and BR-S *hda1* strains, bar 1 mm.

Table 1. **Functional classification of genes differently expressed in structured versus smooth morphotypes**. Functional categories of genes activated (left column) / repressed (right column) in cells from 4- and 7-days old structured biofilm colony morphotypes (represented by BR-F and BR-RF strains) when compared to smooth colony morphotype (represented by BR-S strain). Genes differently expressed only 4^{th} day are in standard letters, genes differently expressed both 4^{th} and 7^{th} day are in bold and genes differently expressed only 7^{th} day are italicized.

Figure 1

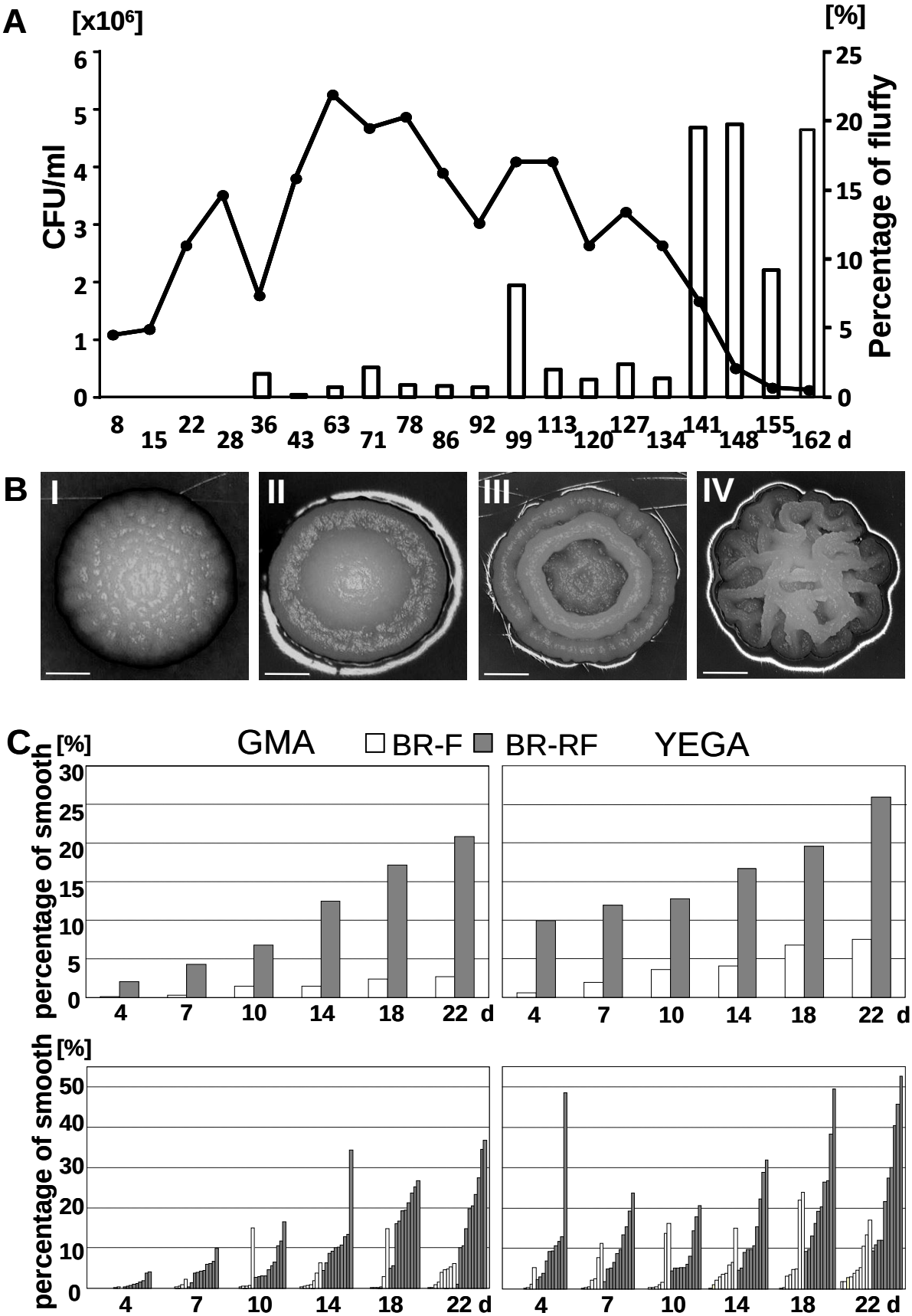

A
[x10⁶]
[%]
CFU/ml
Percentage of fluffy
0
1
2
3
4
5
6
0
5
10
15
20
25
8
15
22
28
36
43
63
71
78
86
92
99
113
120
127
134
141
148
155
162 d
B
I
II
III
IV
C
[%]
GMA
BR-F
BR-RF
YEGA
percentage of smooth
0
5
10
15
20
25
30
4
7
10
14
18
22 d
[%]
percentage of smooth
0
10
20
30
40
50
4
7
10
14
18
22 d

Figure 2

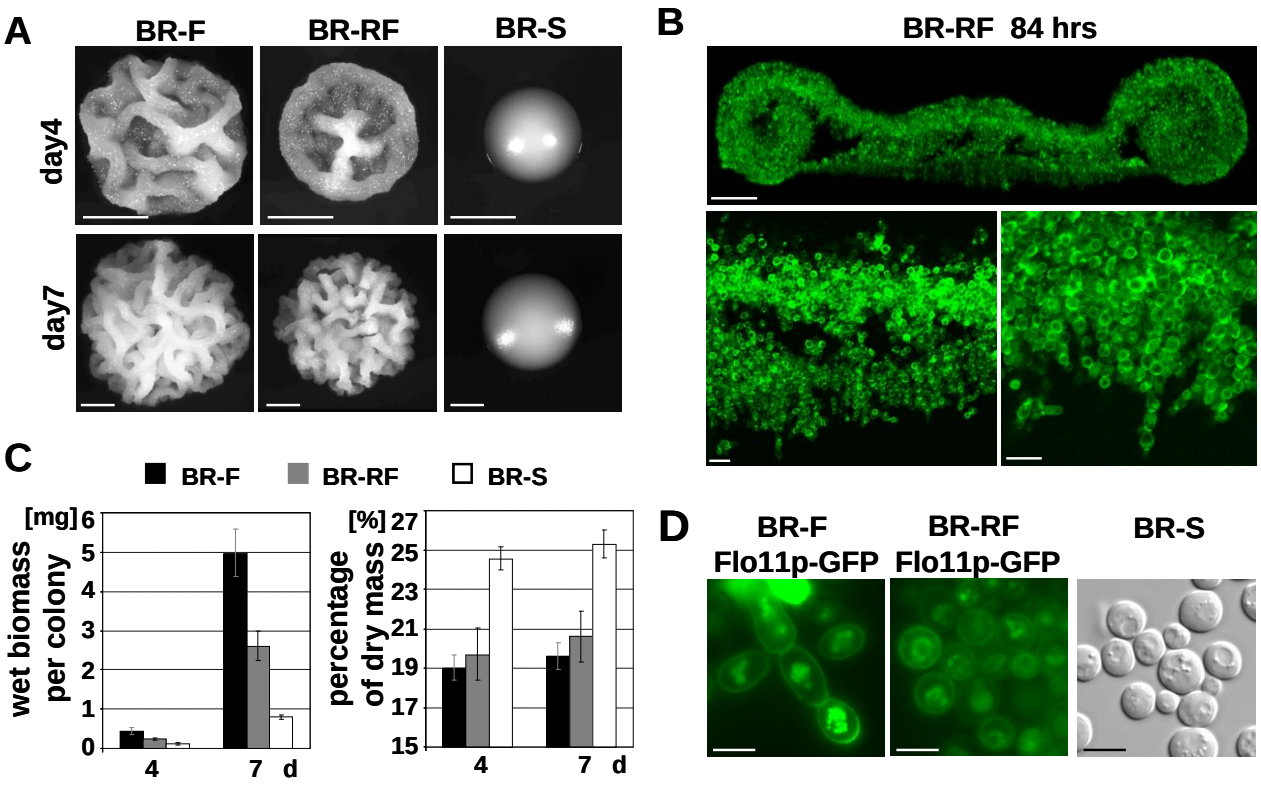


Figure 3

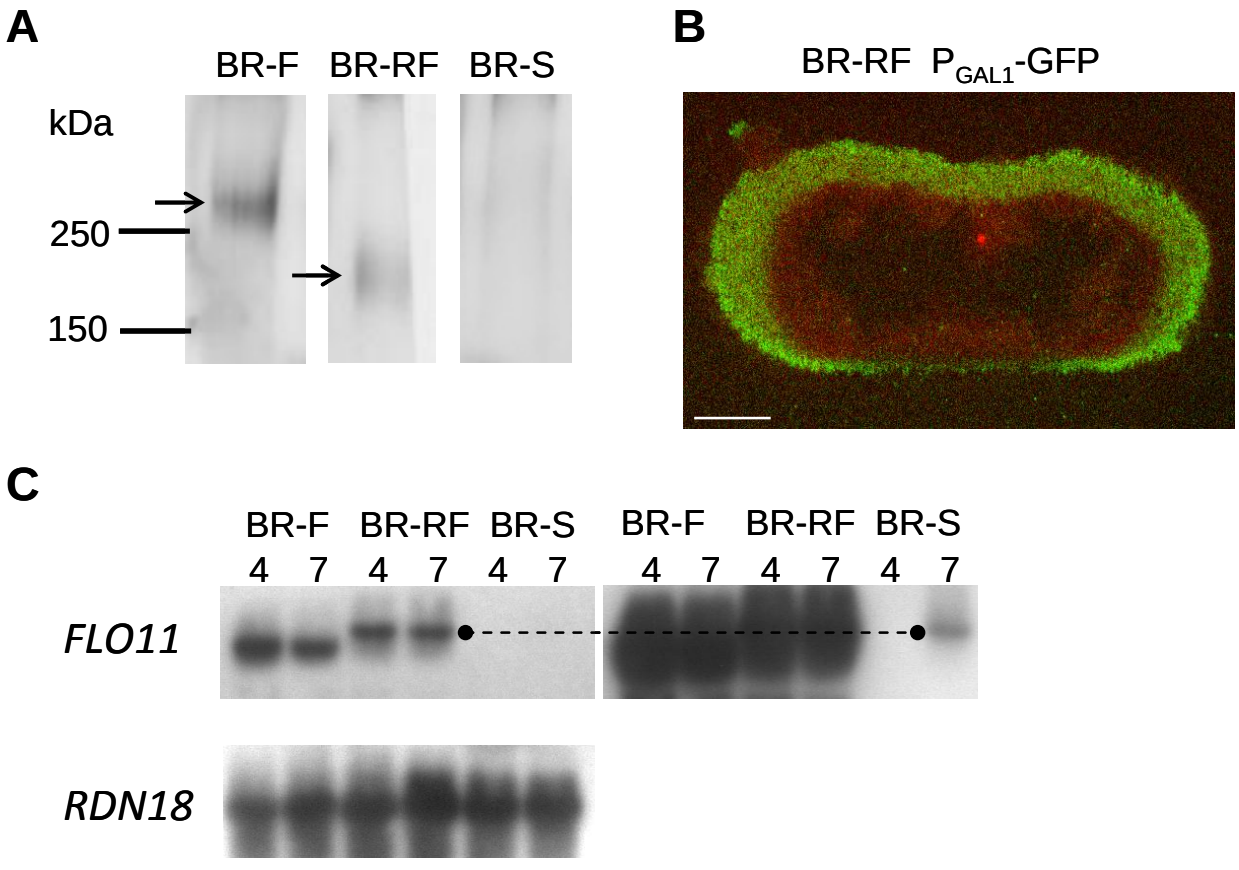


Figure 4

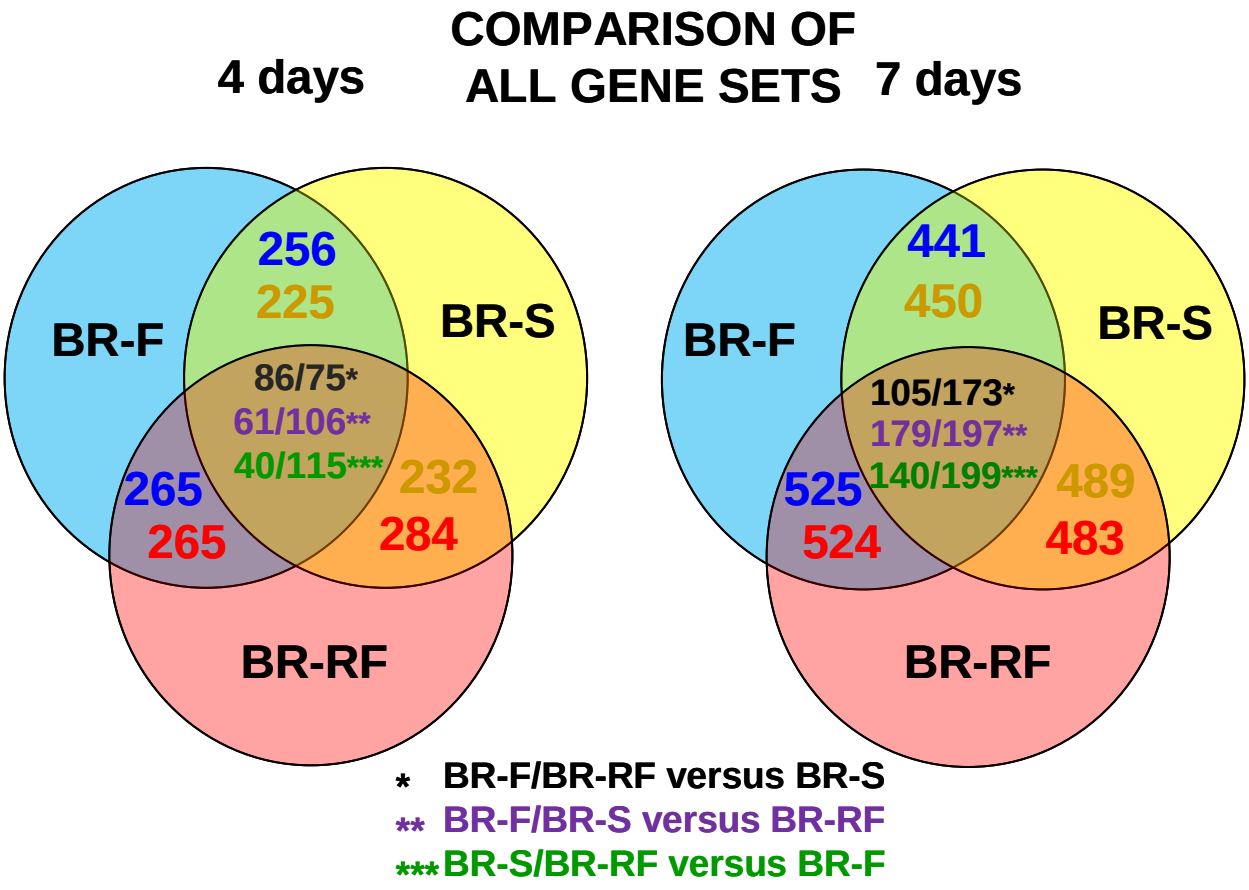
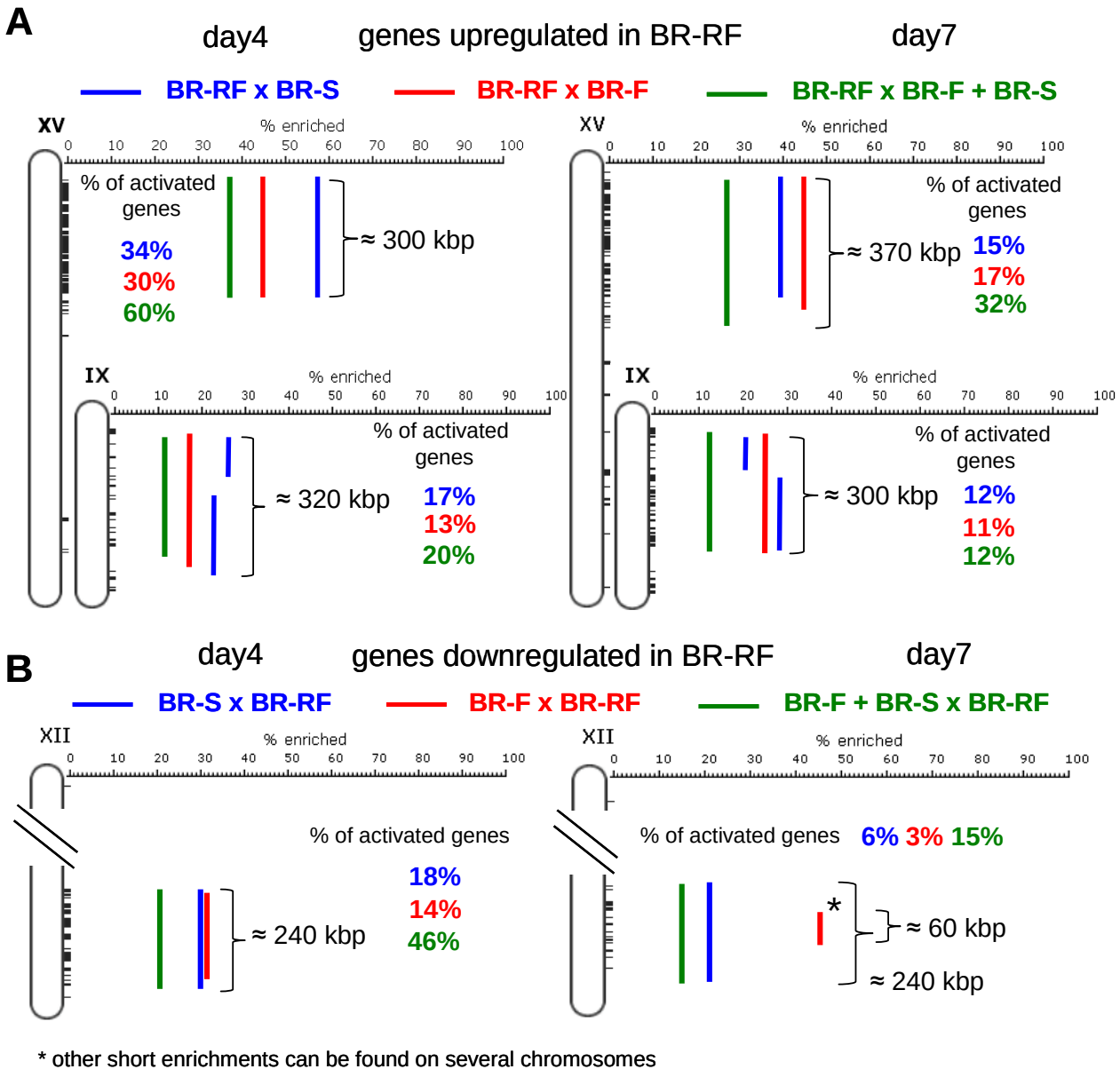

4 days
COMPARISON OF ALL GENE SETS
7 days
BR-F
BR-S
BR-RF
256
225
86/75*
61/106**
40/115***
265
265
232
284
441
450
105/173*
179/197**
140/199***
525
524
489
483
* BR-F/BR-RF versus BR-S
** BR-F/BR-S versus BR-RF
*** BR-S/BR-RF versus BR-F

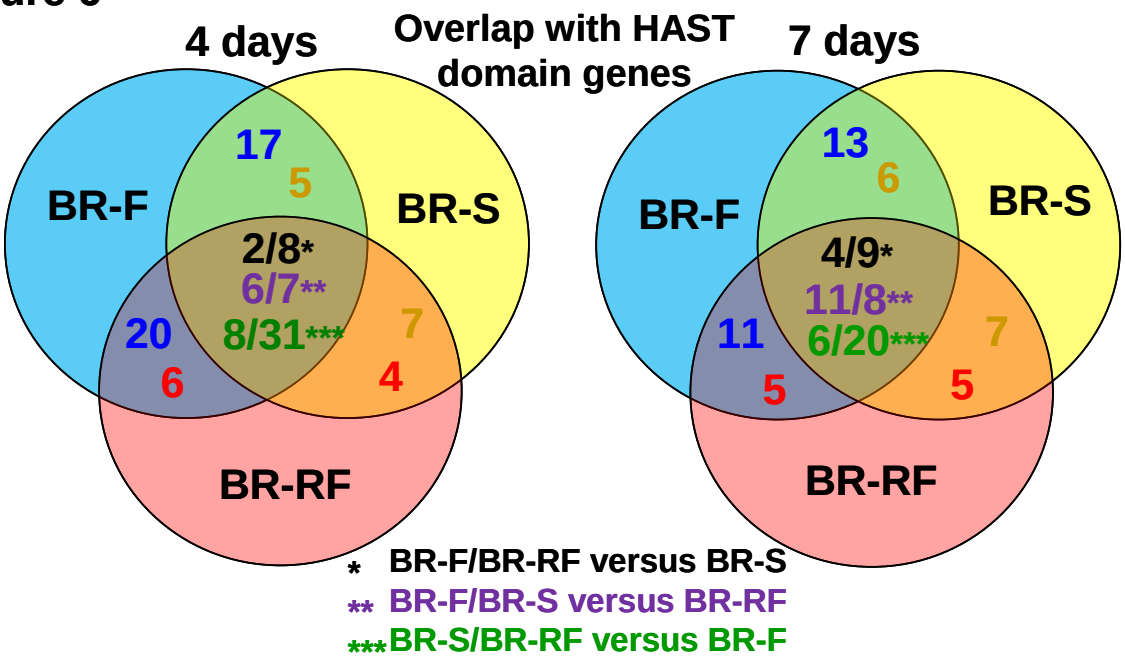
Figure 5



* other short enrichments can be found on several chromosomes

Figure 6

A



B

HAST domain genes induced in BR-F	
Metabolism	BIO5, JLP1, **BAT2**, **BDH2**, **BIO3**, **GDH3**, **SOR1**, *ERR3, GDH1*
Glucosidases	**YIL169C**, **YJL216C** **FSP2**, **IMA1**, **IMA2**, **IMA3**, **MAL12**, **MAL32**
Unknown	YLL056C, **YFL051C**, **YHR210C**, **YJL220W**, **REE1**, *YHL044W, COS5*
Transport	MPH3, YCT1, ZRT1, **AQY1**, **FET4**, **MAL31**, *ARN2, DAL5, AQY2*
Cell wall	YAR066W, **YAR062W**, **YHR213W**, **YHR214W**, **FIT2**, **FIT3**, **PAU1**, **PAU12**, **PAU24**, *YAR061W, PAU20*

C

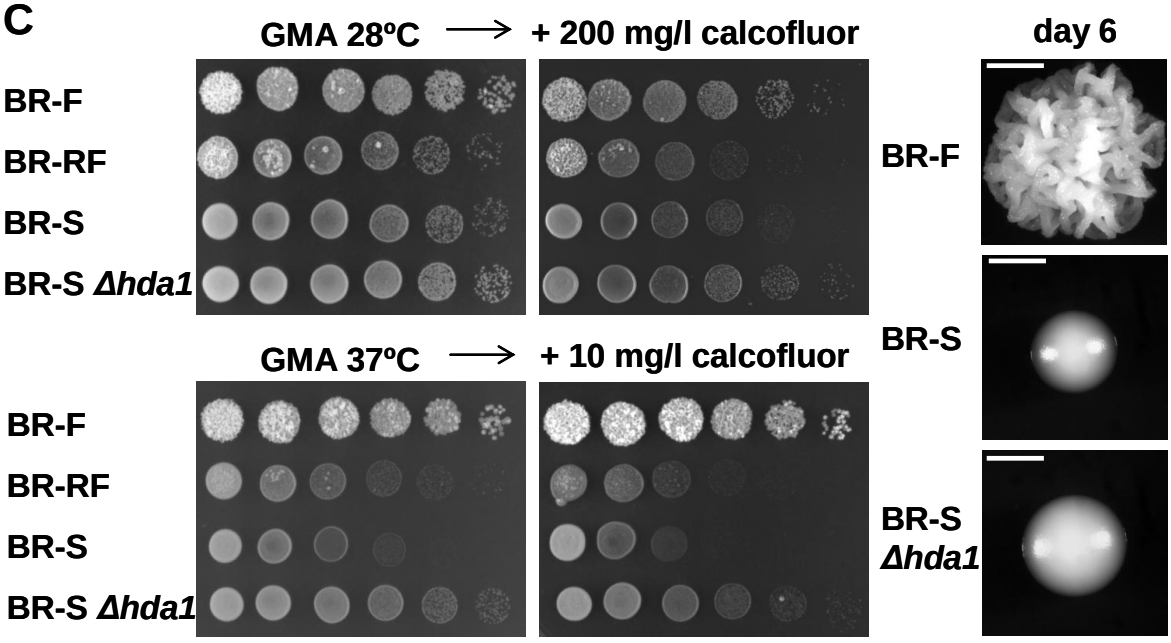


Table 1

	structured biofilm colony morphotype	smooth colony morphotype
Cell wall	YLR042W, SVS1, **ASP3, BSC1,** *OSW5*	**SPS100, CTS1,** *BGL2, CCW14, FLO9, PFS1, PSA1, ZPS1*
Secretory transport & processing	BST1, LST7, PER1, **CWH41, MNN9,** *YOL107W, APM4, GVP36, YIP4*	BTN2, NCE102, **GYP7**, *KAP95, KTR4, PEP12, RCR1, SNC2, TIM17, TIM21*
Metabolism	JLP1, MLS1, SNO1, SNZ1, SNZ2, TPI1 **—** *YMR226C, BNA1, DFR1, ENO1, HPT1, MDH2, RHR2, SOL4*	PIG2, **SFA1**, **STR3**, *CRS5, CUP1-1, FBP26, FOL2, FRE6, FRE7, MTD1, NFS1*
Aminoacids	ARG3, ARG4, BAT1, MET17, MET22, **ARG1,** GDH3, LAP3	*GCV1, GCV2, GCV3, SHM2*
Lipids & fatty acids	INO1, VAC14 **—** *ECI1, POT1, POX1, TES1, VPS66*	YNL144C, ERG3, ERG4, HFD1, **CEM1**, *CSG2, SUR1, SUR4*
Nucleotides		RNR4 **—** *ADE1, ADE2, ADE8, ADE13, PRS3, URA2*
Transport	ITR1, PUT4, VHT1, **PDR12, VBA3,** *ATO2, CAN1, GAP1, MEP2, PIC1*	MUP3, PHO84, THI74, ZRC1, **HXT5, HXT15**, **HXT17**, **MAL11**, **PHO89**, *YFL054C, HXT1, HXT2, HXT3, HXT4, HXT6, HXT7, HXT10, HXT11, HXT12, HXT13, PHO87, ZRT2*
Degradation	O*MA1, HSP33, MGR1, NAS2*	*ATG8, BSD2, CIC1, DFG16, GID8, JID1, UMP1, RPN5, RPN13, RPT2, SNA3, VID24, YPT53*
Stress response	DDR48, GRX3, **TSA1**, *YBL036C, CTA1, DDI3, RAD10, SOD2, TSA2*	OLA1, GRE1, HSP26, HSP42, SPG1, SPG4, SSA4, **APJ1, FES1**, **GPX1, HSP30, HSP78, HSP104, SSE1,** *YNL190W,YOR186W, AAD6, CCT5, CPR6, DUN1, GLO1, GSH1, HSP150, MGE1, OYE3, PST1, RCN2, SED1, STI1, TRX3, YDJ1,YGP1*
Regulation		
Translation & RNA processing	BRR2, MTQ2, **DUS4**, **SLF1**, **SPP381**, *IST3, NTR2, POA1, RPP1A, RPR2*	PUS2, SLH1**, NGL3, RPA135**, **RSC30,** *YDR341C, CBF5, SRO9, RPS30B, RPL35B, RRP3, RRP7, SNU66, SRC1*
Signal transduction	ASG7 *— PKH1, FAR3*	GPA2, MRK1, STD1, **LST8**, **RGS2,** *YMR291W, GLC8, HRK1, KIC1, MTH1, STE7, YAK1*
Cell cycle & polarity	**SHE1**	PCL9, HBT1, TAH11, **CLG1,** *CDC13, CDC3, DSE1, VHS1*
Transcription	CUP9, SFG1, TEC1, **YAP7,** *RDS1*	HMS1, **YFL052W, RLM1, USV1**, **ZPR1**, *ALPHA2, CIN5, HAP4, OPI1, PHO2, STP2, STP4*
- chromatin structure		**TOS8**, *HHT1, HIR2, TMA23 ,TOD6*
General transcription		*IWR1, RBA50, RPA135, RPB10, SPT15, SUA7, TAF12, TFA1*
Transposons	21 genes, **12 genes,** *0 genes*	
Unknown	12 genes, **6 genes,** *24 genes*	8 genes, **5 genes,** *16 genes*
Others	*MDV1, SPO7, VMA4*	YLR164W, **DIA1, DIA3, MRH1, MRPS17**, *IXR1, PIN3*

6. Diskuse

Kvasinky, podobně jako celá řada dalších mikroorganismů, tvoří při růstu na rozhraní dvou skupenství různá mnohobuněčná společenství. Takové útvary reprezentují zejména biofilmy, komplexní buněčné aglomeráty charakteristické svou komplikovanou trojrozměrnou strukturou, které pozorujeme převážně u patogenních kvasinek (BLANKENSHIP & MITCHELL, 2006; RAMAGE et al., 2010), a kolonie - útvary vznikající na pevných površích (v laboratořích na agarových médiích), považované za méně heterogenní a prostorově omezenou obdobu biofilmu (PALKOVÁ, 2004). Existence v rámci mnohobuněčných útvarů je preferovaným životním stylem kvasinek v přirozeném prostředí, kdy charakter a vlastnosti takových společenství poskytují řadu výhod pro přežívání v často nepříznivých podmínkách vnějšího prostředí (MARKX et al., 2004; PALKOVÁ & VÁCHOVÁ, 2006).

Kmeny kvasinek izolované z přirozených ekosystémů často tvoří kolonie charakteristické komplikovanou trojrozměrnou strukturou. Takto prostorově heterogenní útvary pozorujeme zejména u patogenních kvasinek *C. albicans* a *C. neoformans* (JAIN et al., 2008). Tvorba strukturovaných kolonií je však rovněž charakteristická i pro přírodní kmeny *S. cerevisiae*, kdy tuto schopnost mají například kmeny izolované z vinných hroznů (CAVALIERI et al., 2000) či vodního prostředí (KUTHAN et al., 2003), kmeny používané při výrobě vína (FIDALGO et al., 2008) a také některé klinické izoláty jinak spíše neškodného druhu kvasinky (GRANEK & MAGWENE, 2010). Oproti tomu běžně používané laboratorní kmeny tvoří na první pohled nediferencované hladké kolonie s pravidelnými okraji rostoucí převážně v horizontálním směru (VÁCHOVÁ et al., 2009). Z tohoto pohledu velmi podstatnou výjimku v rodině „laboratorních" kmenů však tvoří kmeny používané pro studium vývojových programů buněk jako je sporulace či buněčná morfogeneze (viz kap. 3.2.3.1 a 3.2.3.3), jejichž kolonie tvarem a strukturou připomínají spíše kolonie kmenů přírodních (GRANEK & MAGWENE, 2010). Zatímco jejich laboratorní souputníci jsou často selektováni pro vlastnosti umožňující jejich snadnou kultivaci a manipulaci, zejména kmen ∑1278 si udržel řadu rysů charakteristických pro přírodní kmeny jako je silná adhezivita či schopnost vláknitého růstu (KRON, 1997).

Mezibuněčné interakce a signály při vývoji strukturovaných kolonií

Při vývoji početných populací kmene *S. cerevisiae* ∑1278 či jeho haploidní varianty $\sum S^h$ (VOPÁLENSKÁ et al., 2005) na pevném médiu dochází k modulaci charakteru růstu buněk na okrajích vznikajících mikrokolonií, ke změně z axiálního na polární způsob pučení a tvorbě

vláknitých buněk. K jejich vzniku a růstu dochází dominantně ve směru sousední mikrokolonie, což vede až k postupnému sjednocování jednotlivých populací. K tomuto jevu dochází již velmi brzy po inokulaci buněk a tedy nezávisle na stavu živin (kap. 5.1.). Je to tedy proces odlišný od před mnoha lety objeveného vláknitého růstu, kterým buňky reagují na nedostatek dusíku (GIMENO et al., 1992), případně jiných živin (BRAUS et al., 2003; ZARAGOZA & GANCEDO, 2000). Raný orientovaný pseudohyfální růst sousedících mikrokolonií je rovněž nezávislý na přítomnosti povrchového adhezinu Flo11p (kap. 5.1.), přičemž však byla prokázána jeho esencialita pro hladověním indukovaný vláknitý růst (LO & DRANGINIS, 1998).

Důležitým faktorem ovlivňujícím indukci orientovaného vláknitého růstu je ovšem hustota populace, kdy početnější populace procházejí rychlejším přechodem na vláknitý růst a dřívějším sjednocením populace, zatímco buňky solitérních mikrokolonií dimorfický přechod nevykazují vůbec. Charakter výše popsaného jevu naznačuje existenci určitého způsobu mezibuněčné komunikace (kap. 5.1.). K pseudohyfálnímu růstu v populacích o vysoké buněčné hustotě rovněž dochází indukčním působením aromatických alkoholů, k jejich produkci však také dochází pouze při hladovění na dusík a jeho přítomnost v dostatečném množství takové dimorfické přechody inhibuje (CHEN & FINK, 2006). Naopak orientovaný vláknitý růst je indukovatelný amoniakem, přítomností vyšší koncentrace amonných iontů a částečně také zvýšeným pH (kap. 5.1.). Zjištění, že hustší inokulace buněk vede k dřívější alkalizaci okolního média společně se skutečností, že i při růstu obřích kolonií laboratorních kmenů dochází krátce po inokulaci k produkci krátkého pulzu amoniaku (PALKOVÁ et al., 1997), naznačuje přímou roli amoniaku v komunikaci mezi mladými sousedními mikrokoloniemi. Suplementace role amoniaku pomocí různých těkavých aminů či zvýšené koncentrace amonných iontů vede k myšlence, že mechanismus funkce amoniaku spočívá v modulaci pH uvnitř buněk podobně jako je tomu i v případě řady vývojových procesů u sociální hlenky *D. discoideum* (GROSS et al., 1983). Amoniak byl identifikován jako molekula sloužící jako signál vedoucí ke změnám v metabolismu, adaptaci na omezené množství živin a také k růstové inhibici ve směru produkce amoniaku (PALKOVÁ & VÁCHOVÁ, 2003). Podobně jako již bylo dříve popsáno (GIMENO et al., 1992), i v případě naší studie přítomnost zvýšené koncentrace amonných iontů inhibuje vláknitý růst v pozdějších fázích vývoje populace (kap. 5.1.). Tato fakta naznačují, že role amoniaku i vláknitého růstu je zřejmě zcela závislá na vývojové fázi určitých populací. Při raných fázích vývoje populací může docházet k tvorbě gradientu amoniaku produkovaného rostoucími mikrokoloniemi, který je rozeznáván populacemi v okolí a indukuje příslušné změny vedoucí k orientovanému růstu a sjednocení

populací. V tomto kontextu role amoniaku jako induktoru synchronizujícího populační vývoj připomíná quorum sensing fenomén sloužící ke koordinaci chování početných buněčných populací (viz kap. 3.2.4.1.) (PAPPAS et al., 2004). Vedle toho je zajímavá rovněž možná role amoniaku jako atraktantu při vývoji kvasinkových populací v přirozených ekosystémech a kolonizaci určitého prostředí, kdy je amoniak uvolňován například při procesu zrání ovoce (GATTO et al., 2008).

Kvasinkové populace tedy disponují mechanismy, které umožňují jejich vzájemné srůstání vedoucí ke vzniku jednotné početnější komunity. Takové chování kvasinkových populací připomíná aktivní agregaci pohyblivých buněk myxobakterií či hlenek nezbytnou pro vznik mnohobuněčných plodnic (KAISER, 1986). Vzájemné ovlivňování a fúze sousedních populací rovněž pozorujeme při raných fázích vývoje kolonií *E. coli* (SHAPIRO, 1992). Vývoj takových populací je řízen pravidlem maximalizovat vzájemný kontakt a navyšovat svou buněčnou hustotu spíše než zajišťovat přístup individuálních buněk k volnému substrátu (SHAPIRO, 1998). Sdružování populací do početnějších útvarů je tedy obecnější fenomén, který může v přirozených podmínkách sloužit k efektivnímu zbudování mnohobuněčného útvaru a rychlé produkci společných ochranných mechanismů. Koordinovaný vývoj v rámci společné komunity díky efektivní kooperaci buněk na stavbě útvaru také může zamezovat případné budoucí kompetici o prostor a živiny (kap. 5.1.).

Faktory přispívající k vývoji strukturovaných kolonií

Schopnost přírodních kmenů kvasinek *S. cerevisiae* tvořit tvarově různorodé komplexní kolonie a zároveň odlišný původ nepříbuzných kmenů představuje dobrý systém pro studium vlastností obecně potřebných pro vznik takových typů společenství. Společným rysem strukturovaných kolonií přírodních kmenů *S. cerevisiae* je masivní produkce ECM. Její množství klesá s komplexitou kolonií, kdy malé množství ECM nacházíme v méně strukturovaných koloniích, a v podstatě žádná extracelulární hmota není přítomna v koloniích hladkých (kap. 5.2.). ECM je významnou složkou mnohobuněčných populací kvasinek (viz také kap. 3.2.1.2.), ať již hovoříme o různých typech biofilmů (CHANDRA et al., 2001; ZARA et al., 2009) či shlucích buněk v tekutém médiu (BEAUVAIS et al., 2009), kdy má často rozhodující vliv na jejich stavbu a strukturu. V biofilmech *C. albicans* ECM zabezpečuje vzájemné propojení mikrokolonií, jejich prostorové uspořádání, tvorbu póru a kanálků a tím vznik typické houbovité architektury (DOUGLAS, 2003). V koloniích přírodních kmenů pak zřejmě plní podobnou strukturální funkci, kdy obaluje a odděluje jednotlivé buněčné shluky

(KUTHAN et al., 2003) a zodpovídá tak rovněž za značnou velikost strukturovaných kolonií ve srovnání s menšími a úsporně strukturně organizovanými koloniemi hladkými (kap. 5.2.). Nepravidelnému uspořádání buněk obalených v exopolysacharidové matrix je rovněž přičítán vznik strukturovaných kolonií *C. neoformans* (FRIES et al., 1999). ECM též udržuje integritu celé populace, kdy vyplňuje mezibuněčné prostory včetně poměrně rozsáhlých nebuněčných dutin uvnitř kolonie a její prostorově specifická produkce může společně s růstovou aktivitou dělících se buněk působit jako mechanická síla zodpovědná za horizontální a posléze rovněž vertikální expanzi kolonie, stabilizaci nově vzniklého prostoru a typický „vrásčitý" vzhled kolonie (kap. 5.3.).

Produkce ECM rovněž zřejmě souvisí s obsahem vody v koloniích, kdy její množství stoupá s komplexitou struktury kolonií a tedy množstvím ECM (kap. 5.2.), která tedy vedle své strukturní funkce může chránit populaci proti dehydrataci. Velký obsah vody zadržované za pomoci ECM je typický rys i pro mikrobiální biofilmy, kdy extracelulární kapalina může tvořit přes 90% mokré váhy celé populace (MELO, 2005). Vedle vody může ECM rovněž přispívat k akumulaci některých pro růst potřebných látek, či sama o sobě sloužit jako zdroj živin (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Její lokalizace v rozsáhlých nebuněčných dutinách tedy představuje ideální prostor pro rozšiřování nových generací buněk uvnitř kolonie (kap. 5.3.). Složení ECM strukturovaných kolonií přírodních kmenů není známé, lze však předpokládat, že významnou složku budou tvořit polysacharidy, podobně jako v případě dalších mnohobuněčných útvarů kvasinek (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2006; BEAUVAIS et al., 2009). Právě polymery různých sacharidů tvořících vnější vrstvy mikrobiálních buněk jsou charakteristické svou retenční kapacitou (PAVLOVA et al., 2005; SUTHERLAND, 2001) a jsou tak pravděpodobně zodpovědné mimo jiné také za hygroskopické vlastnosti ECM. Určitou roli v ECM přírodních kmenů by mohly hrát rovněž proteiny. Proteiny plní nezastupitelnou strukturní úlohu v ECM biofilmů některých bakterií (BRANDA et al., 2006), kdy mohou tvořit v některých případech i majoritní složku matrix (CUCARELLA et al., 2004). Fluidní extracelulární matrix kvasinkových „matů" může být tvořena proteinem Flo11p částečně uvolňovaným z buněčné stěny do extracelulárního prostoru (KARUNANITHI et al., 2010). Přítomnost extracelulárního vysokomolekulárního proteinu byla zaznamenána ve strukturovaných koloniích přírodního kmene BR-F, zatímco podobná komponenta není přítomna v hladkých koloniích laboratorních kmenů (KUTHAN et al., 2003). Nezdá se však, že by takový protein byl obecným rysem strukturovaných kolonií, kdy se nenachází v extraktech z kolonií dalších přírodních kmenů a jeho role v tvorbě ECM tak není objasněna (kap. 5.2.). Je možné, že u některých kmenů nedochází k jeho uvolňování do mezibuněčného prostoru,

podobně jako je tomu v případě tvorby ECM flokulujících buněk produkujících protein Flo1p (BEAUVAIS et al., 2009), nebo se na tvorbě ECM rovněž podílí jiné extracelulární proteiny, jejichž množství je obecně výrazně vyšší ve strukturovaných koloniích. Stejně tak je ovšem možné, i vzhledem k odlišnému sacharidovému metabolismu jednotlivých kmenů, že složení ECM nepříbuzných přírodních kmenů je odlišné co do obsahu sacharidů i proteinů. Rozdíly ve složení ECM jsou běžnou skutečností v porovnání různých druhů a kmenů bakterií (LOPEZ et al., 2010) i kvasinek (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2006).

Tvar a struktura mnohobuněčných útvarů kvasinek často odráží morfologické charakteristiky buněk, ze kterých jsou složeny. Vznik strukturovaných kolonií některých kvasinek schopných přechodů mezi morfologicky odlišnými buňkami (viz kap. 3.2.1.3.1) je tak přímo spojen s dominantní přítomností určitého buněčného typu. Kolonie některých dimorfických druhů kvasinek jsou hladké, pokud jsou tvořeny pouze kvasinkovými buňkami (POMES et al., 1985). Avšak v případě, že buňky rostou ve formě pseudohyfálních či hyfálních vláken indukovaných specifickými faktory či mutačním fenotypem tvoří zpravidla kolonie výrazně strukturované (BAUER & WENDLAND, 2007; WARTMANN et al., 2000). Častěji jsou však strukturované kolonie složené z několika různých buněčných typů a specifická struktura kolonií je závislá na zastoupení jednotlivých buněčných typů a jejich specifické lokalizaci (LAFFEY & BUTLER, 2005; RADFORD et al., 1994), podobně jako je tomu u biofilmů (BAILLIE & DOUGLAS, 1999). Vertikální růst kolonie kmene ∑1278 je spojen s přechodem buněk na vláknitý růst závislý na přítomnosti Flo11p, ke kterému dochází v rámci celé kolonie a to i u solitérních kolonií, jejichž buňky nevykazují odlišně regulovaný raný orientovaný vláknitých růst vedoucí ke srůstání sousedních populací. Elongace buněk v rámci buněčných shluků a jejich polarizovaný růst ve formě pseudohyfálních vláken se tedy zřejmě podílí na vybudování charakteristické trojrozměrné architektury kolonie (kap. 5.1.). Při maturaci biofilmů *C. albicans* dochází také k expanzi populace, na které se podílejí vláknité buňky, a která vede ke vzniku typické vrstevnaté struktury biofilmu (RAMAGE et al., 2002c). „Vrásčitost“ kolonií určitých kmenů *C. albicans* je rovněž přičítána přítomnosti vláknitých buněk, které tvoří povrchové vrstvy kolonií (RADFORD et al., 1994). Tvorba pseudohyf je rovněž charakteristickou vlastností řady přírodních kmenů *S. cerevisiae* (CASALONE et al., 2005). Některé kmeny však tvoří strukturované kolonie, aniž by vykazovali pseudohyfální růst a morfologie jejich buněk se ani jinak zásadně neliší od buněk kolonií hladkých (kap. 5.2.). Kolonie jiných kmenů, schopných tvorby vláknitých buněk, zase obsahují pseudohyfy zejména na bázi kolonie, kde invadují agar a tvoří podpovrchovou strukturu upevňující útvar k substrátu, zatímco povrchové vrstvy jsou složeny z oválných buněk (kap. 5.3.). Podobnou

stratifikaci můžeme nalézt i ve strukturovaných koloniích určitých kmenů *C. albicans*, kdy vrchní část je tvořena kvasinkovými buňkami, zatímco hyfální buňky se nacházejí uprostřed kolonie a v masivní míře rovněž zarůstají do média (PESTI et al., 1999). Některé kmeny *C. neoformans* jsou také schopné tvorby pseudohyfálních buněk a taková změna se může projevit na struktuře kolonie, „vrásčité" kolonie jsou však tvořeny z tvarově homogenních kvasinkových buněk a vznik struktury kolonie je závislý na jejich trojrozměrném uspořádání (FRIES et al., 1999). Jak je vidět, morfogeneze buněk může plnit různé funkce při vývoji populací v závislosti na studovaném kmeni a není pouhou reakcí buněk na hladovění (kap. 5.1.). Rozhodně však není ani univerzálně využívaným mechanismem potřebným pro vývoj strukturovaných kolonií. Podobně ani polarita pučení buněk v koloniích přírodních kmenů není pro vývoj jejich struktury rozhodující (kap. 5.2.) a podporuje předchozí zjištění, že absence genů definujících výběr místa pučení neovlivňuje zásadně strukturu a morfologii kolonií (VOPÁLENSKÁ et al., 2005).

Vznik strukturovaných kolonií přírodních kmenů *S. cerevisiae* je závislý na přítomnosti povrchového adhezinu buněčné stěny Flo11p, kdy absence genu *FLO11* vede ke ztrátě schopnosti tvorby trojrozměrné architektury (kap. 5.2.). Jeho role je tedy poměrně univerzální, ovšem také značně pleiotropní (viz také kap. 3.2.2.2.1.). Bylo prokázáno, že je nezbytný rovněž pro tvorbu strukturovaných kolonií výše zmíněných laboratorních kmenů (GRANEK & MAGWENE, 2010), vznik vláknitého růstu (LO & DRANGINIS, 1998), tvorbu „florů" na povrchu sherry (ISHIGAMI et al., 2004) a rovněž biofilmových povlaků na plastových površích (REYNOLDS & FINK, 2001), tedy celou řadou fenotypů spojených s mnohobuněčným chováním kvasinek. Exprese genu *FLO11* přímo koreluje se strukturovaností kolonií, kdy je nejvyšší ve strukturovaných koloniích a velmi nízká v koloniích hladkých (kap. 5.2.). Souvislost s úrovní exprese a strukturou kolonie lze pozorovat rovněž u vinařských „flor" kmenů obsahujících specifickou alelu genu *FLO11* (FIDALGO et al., 2006), jejíž zvýšená exprese je zodpovědná za komplexní morfologii kolonií (BARRALES et al., 2008). K produkci proteinu dochází nezávisle na morfologii buněk, kdy Flo11p lokalizuje na povrch oválných i vláknitých buněk a to i současně v koloniích složených z obou buněčných typů a není tedy specifický pouze pro vláknité či invazivní buňky, jak ukazují některé studie (GUO et al., 2000; HALME et al., 2004). Flo11p je sice rovněž nezbytný pro tvorbu pseudohyfálních buněk (nikoliv však raného orientovaného růstu pozorovaného u populací kmene ∑1278) a tím může přispívat k vývoji trojrozměrné architektury (kap. 5.1.), jeho obecnou funkcí v kontextu vzniku strukturovaných kolonií se však zdá být participace na tvorbě mezibuněčných fibrilárních spojů. Tato mezibuněčná

spojení zajišťují vzájemnou buněčnou adhezi, stabilitu celé kolonie a rovněž poskytují flexibilitu povrchovým vrstvám buněk a umožňují tak vertikální expanzi kolonií a jejich „vrásčitý“ vzhled (kap. 5.3.). Podobné vláknité projekce vnějších vrstev buněčné stěny připisované adhezivním proteinům byly zaznamenány rovněž u buněk *C. albicans* (TOKUNAGA et al., 1986) a v méně výrazné podobě u flokulujících buněk *S. cerevisiae* produkujících protein Flo1p (BEAUVAIS et al., 2009). Mechanismus vzájemné vazby buněk zprostředkované proteinem Flo11p není zřejmý. Byl však prokázán potenciál proteinů Flo11p k homotypické interakci, tedy vzájemné vazbě dvou stejných proteinů, pravděpodobně rozeznáváním specifické glykosylace (DOUGLAS et al., 2007). Přechod na vláknitý růst buněk předcházející tvorbě strukturovaných kolonií kmene $\sum S^h$ je provázen změnami v lokalizaci proteinu Flo11p. Z místa kontaktu buněk zůstávajících po vypučení spojených se v průběhu dimorfického přechodu Flo11p přesouvá rovněž na distální pól elongovaných pseudohyfálních buněk a k rozšíření na celý povrch dochází až v pozdějších fázích vývoje kolonie (kap. 5.1.). Podobná lokalizační změna je charakteristická pro některé proteiny umožňující polární pučení a tvorbu invazivních vláknitých buněk (CULLEN & SPRAGUE, 2002). To naznačuje, že vedle adheze mezi polárně pučícími buňkami nezbytné pro vznik pseudohyf a tvorby podélných mezibuněčných spojů potřebných pro tvorbu strukturovaných kolonií, by se protein Flo11p mohl určitým způsobem podílet i na zajištění polarity buněčného růstu. Podobnou lokalizaci proteinu Flo11p, i když ne tak zřetelnou jako u kmene $\sum S^h$, je možné pozorovat i v mladých koloniích diploidních přírodních kmenů a to dokonce nezávisle na morfologii buněk (kap. 5.2.). Tento jev by mohl v případě strukturovaných kolonií přírodních kmenů sloužit k produkci polarizovaných invazivních buněk zarůstajících do média, kdy tuto funkci mohou plnit u kmenů netvořících pseudohyfy oválné buňky uspořádané do řetízků (nepublikovaná data). Absence genu *FLO11* rovněž vede ke ztrátě adhezivity kolonií k substrátu (kap. 5.1.). Zda je však za tuto skutečnost obecně zodpovědná funkce Flo11p při tvorbě adhezivních vláken či nespecifické zvyšování hydrofobicity povrchu buněk, jako je tomu při adhezi buněk k abiotickému povrchu (REYNOLDS & FINK, 2001), či kombinace obojího, není možné v současné situaci jednoznačně určit.

Ochranné mechanismy kvasinkových populací

Od brzkých fází vývoje kolonií přírodních kmenů kvasinek dochází k prostorové a funkční diferenciaci různých buněčných populací. Tyto populace se podílejí s využitím různých mechanismů na ochraně celého společenství. Od počátku vývoje populace se na okraji celých,

prostorově ještě nepříliš diferencovaných kolonií ustavuje tenká vrstva buněk v bezprostředním kontaktu s okolním prostředím, a to jak vzduchem, tak pevným substrátem, které jsou vybavené membránovými proteiny Pdr5p a Snq2p (kap. 5.3.) z rodiny ABC (ATP binding cassette) transportérů schopných aktivním procesem za podpory energie generované štěpením ATP odstraňovat z buněk širokou škálu látek včetně substrátů toxických (ROGERS et al., 2001). Takové tzv. efluxní pumpy přispívají k fenoménu mnohočetné lékové rezistence (MDR), u *S. cerevisiae* nazývanému pleiotropní léková rezistence (PDR) a jejich absence vede ke zvýšené senzitivitě buněk k určitým látkám (SIPOS & KUCHLER, 2006). Vzhledem ke svým vlastnostem a lokalizaci v kolonii se tak zmíněné transportní proteiny podílejí na ochraně koloniálních populací před vnějšími vlivy. Jejich produkce je i v koloniích regulována transkripčním regulátorem Pdr1p (BALZI et al., 1987), jehož absence má za následek redukci ochranné vrstvy (kap. 5.3.). Určitou úlohu hrají MDR transportéry i v rezistenci biofilmů *C. albicans*. Byla prokázána jejich zvýšená exprese v určitých fázích vývoje biofilmu ve srovnání s planktonními buňkami (RAMAGE et al., 2002a), která může souviset se zvýšenou rezistencí biofilmů vůči některým látkám (MATEUS et al., 2004). Absence MDR transportérů vede ke snížení rezistence vůči azolovým antimykotikům v raných fázích vývoje biofilmu (MUKHERJEE et al., 2003). Podobně jako ve strukturovaných koloniích, kde s vývojem kolonie dochází k postupnému ztenčování vrstvy buněk obsahujících PDR transportéry (kap. 5.3.), i v biofilmech *C. albicans* se proteiny zodpovědné za lékovou rezistenci mohou určitým způsobem podílet na ochraně společenství ve specifických fázích jeho vývoje, jejich přesná prostorová lokalizace v biofilmu však není známá (RAMAGE et al., 2012). Povrchovou vrstvu buněk bránící průchodu některých látek spatřujeme i u hladkých kolonií laboratorních kmenů. Takové buňky ovšem nejsou vybaveny aktivním ochranným mechanismem a jejich vlastnosti jsou dány pravděpodobně částečně odlišným proteinovým složením buněčné stěny (VÁCHOVÁ et al., 2009). Okrajová vrstva flokulujících buněk je složená dominantně z buněk neprodukujících Flo1p adhezin, které rovněž postrádají ochranné mechanismy a jsou pouze pasivní vnější linií, která je důsledkem povahy vazebných interakcí proteinu Flo1p znemožňující inkorporaci takových buněk dovnitř buněčného shluku (SMUKALLA et al., 2008).

Buňky ve vnějších vrstvách povrchové části kolonie, které jsou v kontaktu se vzdušným okolím, vstupují brzy po ustavení kolonie do stacionární fáze, zatímco buňky uprostřed, na bázi kolonie a v podpovrchových částech se dále efektivně dělí. Tato situace zřejmě není produktem nedostatku živin, kdy k ní dochází skutečně záhy po vzniku populace a distribuce živin do těchto oblastí je velmi efektivní (kap. 5.3.). Stacionární buňky jsou známé svou

značnou odolností vůči široké škále stresových podmínek (HERMAN, 2002) a mohou tedy sloužit jako paralelní ochranný mechanismus. Paralelní proto, že část stacionárních buněk v bezprostředním kontaktu s prostředím si udržuje aktivní MDR transportéry (kap. 5.3.). Role fyziologického stavu buněk a jejich růstových a metabolických aktivit, které jsou vzhledem ke značně heterogennímu prostředí v rámci mnohobuněčných útvarů taktéž heterogenní, je často zmiňována i v souvislosti s rezistencí kvasinkových biofilmů. Není však úplně zřejmé, zda nižší růstová aktivita populací v biofilmech působí jako faktor zvyšující rezistenci proti antimykotickým látkám (BAILLIE & DOUGLAS, 1998; CHANDRA et al., 2005). Zřejmé ovšem je, že v biofilmech *C. albicans* se ve zvýšené míře vyskytují stacionárním buňkám podobné, metabolicky dormantní, tzv. perzistující buňky, které jsou vysoce odolné proti stresovým podmínkám a antimykotické terapii (LAFLEUR et al., 2006). Nezdá se, že by byly nějak specificky lokalizované a pravděpodobně se podílejí na perzistenci populace spíše než na její fyzické ochraně (LAFLEUR et al., 2006).

Komplementárně k tvorbě povrchové vrstvy stacionárních buněk a buňkám s aktivními efluxními pumpami obalujícími celou kolonii dochází ke vzniku mechanismu bránícímu průchodu i některých potenciálně toxických látek do vnitřních částí kolonie (kap. 5.3.). Za tento efekt je pravděpodobně zodpovědná zpočátku centrálními buňkami produkovaná ECM, která se postupně rozšiřuje do celé kolonie, včetně podpovrchových částí. Zdá se tedy, že vedle své strukturní a integrální role při vývoji kolonie (viz výše), slouží ECM rovněž jako selektivně propustná ochranná bariéra (kap. 5.3.). Flokulující buňky produkují polysacharidovou matrix, která brání průchodu některých větších proteinových komplexů, avšak neúčastní se rezistence „floků“ proti chemickým stresorům (BEAUVAIS et al., 2009). Potenciál ECM ve fyzickém zadržování řady antimykotických látek a tím její role v rezistenci byla prokázána u biofilmů *C. albicans* (NETT et al., 2010). Komponentou zodpovědnou za takové absorpční vlastnosti ECM je polysacharid β-1,3 glukan, kdy jeho snížená produkce nevede ke změně v architektuře biofilmu, zásadně však ovlivňuje jeho rezistenci vůči antimykotikům (NETT et al., 2011).

Je zřejmé, že ochrana a odolnost mnohobuněčných populací kvasinek je velmi komplexní proces, na kterém se podílejí časově i prostorově divergentní buněčné populace generující odlišné ochranné mechanismy. Jejich vzájemná koordinace a komplementarita je pak klíčovým faktorem, který je nezbytný pro profit celé populace (kap. 5.3.). Strukturovaná kolonie přírodních kmenů *S. cerevisiae* poskytuje dobré možnosti, kterak právě syntézu mnoha výše popsaných dějů studovat na populační úrovni a může tak pomoci k objasnění extrémní rezistence mnohobuněčných společenství kvasinek, biofilmů především.

Fenotypové změny přírodních populací kvasinek

Vedle tvorby strukturovaných kolonií je typickou vlastností přírodních kmenů kvasinek *S. cerevisiae* značná fenotypová heterogenita, projevující se schopností tvorby několika morfologicky odlišných typů kolonií (kap. 5.2.). Tento jev je charakteristický pro tzv. přepínání fenotypů objevující se ve zvýšené míře zejména u klinických izolátů patogenních kvasinek *Candida* sp. (LACHKE et al., 2002; SOLL, 1992) či *C. neoformans* (GUERRERO et al., 2006), kde umožňuje generaci fenotypů vykazujících zvýšenou virulenci. Podobně jako je tomu v případě domestikace přírodního kmene BR-F a tedy ztrátě schopnosti tvorby strukturovaných kolonií (kap. 3.4.) (KUTHAN et al., 2003) dochází i k přechodům mezi různými fenotypy přírodních kmenů při kultivacích na komplexních médiích za stabilních podmínek pouze ve směru méně strukturovaných variant (kap. 5.2.) Kultivace myxobakterií v neměnných podmínkách chemostatu rovněž způsobuje ztrátu jejich sociálního chování, což vede až k neschopnosti tvorby mnohobuněčných útvarů (VELICER et al., 1998). Nevratný domestikační proces představuje evoluce laboratorních kmenů mikroorganismů. Pozadím tohoto procesu je však dlouhodobý vývoj takových kmenů ve stabilním prostředí a selekce a fixace pomalých mutačních změn (AGUILAR et al., 2007; KRON, 1997). Proces domestikace přírodních kmenů je však rychlý a efektivní a splňuje tak spíše charakter přepínání fenotypů.

Přepínání fenotypů je primárně charakterizováno jako náhodný a reverzibilní proces, který probíhá v obou směrech i za konstantních vnějších podmínek (SOLL, 1992). Řada faktorů vnějšího prostředí však může frekvenci přepínání modulovat (ALBY & BENNETT, 2009b) či fenotypové přechody přímo vyvolávat (VAN DER WOUDE, 2006). Přítomnost stabilních podmínek a bohatých médií tedy představuje spouštěcí faktor, který fenotypové přechody přírodních kmenů indukuje. Tyto změny lze rovněž považovat za náhodné v tom smyslu, že není možné predikovat, která z buněk v populaci „přepne“ na jiný fenotyp (VAN DER WOUDE, 2006). Domestikovaný kmen BR-S, který na komplexních médiích tvoří stabilně kolonie hladké, si ovšem udržuje schopnost při dlouhodobé statické kultivaci v nepříznivých podmínkách s určitou frekvencí měnit svůj fenotyp, procházet reverzním procesem a tvořit dokonce několik morfologicky rozdílných strukturovaných typů kolonií (kap. 5.4.). Přepínání fenotypů patogenních kvasinek je též často indukováno stresovými faktory, ať již specifickými (ALBY & BENNETT, 2009a) či při expozici populace obranným mechanismům hostitele a vede k produkci odolnějších variant (FRIES et al., 2001). Indukční funkci nepříznivých podmínek a stresu umocňuje fakt, že ke vzniku strukturovaných variant dochází s vyšší frekvencí v pozdějších fázích kultivace, kdy většina populace odumírá (kap. 5.4.).

Nelze ovšem rovněž vyloučit, byť to není pravděpodobné, že k přepínání na fenotyp tvořící strukturované varianty kolonií dochází i na komplexních médiích, avšak s nízkou frekvencí, která je obtížně zaznamenatelná.

Byť jeden z nově vzniklých fenotypů (nazvaný BR-RF) tvoří strukturované kolonie morfologicky velmi podobné koloniím původního přírodního kmene BR-F, některými vlastnostmi se od něj zásadně liší. Vedle určitých odlišností ve fyziologických parametrech je patrný rozdíl zejména v buněčném složení kolonií, kdy strukturované kolonie kmene BR-RF jsou, na rozdíl od protáhlých až vláknitých buněk přírodního kmene BR-F, tvořeny kulatými buňkami, podobně jako hladké kolonie domestikovaného kmene BR-S (kap. 5.4.). To pouze potvrzuje již vyřčené teze, že morfologie buněk není rozhodující faktor uplatňující se při tvorbě strukturovaných kolonií (kap. 5.2.). Další důležitou vlastností, která oba kmeny odlišuje, je jejich stabilita, kdy „zdivočelý" kmen BR-RF tvoří hladké kolonie na komplexních médiích s mnohem vyšší frekvencí než kmen původní. Frekvence přepínání může být u obou kmenů ještě zvýšena přítomností glukosy v médiu a umocňuje fakt, že bohaté kultivační médium indukuje přepínání na hladké varianty (kap. 5.4.). Glukosa a další dobré zkvasitelné zdroje uhlíku jsou rovněž faktorem, který způsobuje přechodnou změnu v morfologii kolonií (nepublikovaná data) (GRANEK & MAGWENE, 2010).

Při opětovném vzniku strukturované kolonie kmene BR-RF dochází i k obnově některých faktorů, které byly postulovány jako nezbytné pro vznik trojrozměrné architektury (kap. 5.2.). Předně je to produkce extracelulární hmoty a rovněž přítomnost její možné strukturní složky v podobě vysokomolekulárního glykosylovaného proteinu, který je charakteristický pro přírodní kmen BR-F a není přítomen v hladkých koloniích domestikovaného kmene BR-S (KUTHAN et al., 2003). Dalším z faktorů, který je nezbytný pro tvorbu strukturovaných kolonií je exprese genu *FLO11* (kap. 5.2.). I v kmeni BR-RF dochází k obnovení jeho exprese. Vedle toho ovšem je patrné zvýšení ve velikosti transkriptu ve srovnání s původním kmenem BR-F (kap. 5.4.). Geny pro adheziny jsou známy svým značným rekombinačním potenciálem, zejména v repetitivní oblasti kódující centrální doménu bohatou na serin a threonin (VERSTREPEN et al., 2004), který způsobuje změny ve velikosti genů a s tím často spojené odlišnosti ve funkci proteinu (FIDALGO et al., 2006). Velmi nízká exprese genu *FLO11* je patrná i v koloniích kmene BR-S a lze tedy zaznamenat, že transkript genu je stejné velikosti jako u „zdivočelého" kmene BR-RF. Je tedy zřejmé, že pokud došlo k nějaké rekombinační události, stalo se tak již v průběhu domestikačního procesu. Variabilitu ve velikosti transkriptu spatřujeme i v koloniích ostatních přírodních kmenů (nepublikovaná data), bez zřejmé korelace mezi velikostí transkriptu a morfologií kolonií. Vliv rekombinace a délky

genu na funkci proteinu Flo11p při vývoji kolonií tedy nelze snadno posoudit. Zdá se však, že spíše než délka genu a potažmo jeho proteinového produktu je kruciální jeho regulace a úroveň jeho exprese (kap. 5.4.). V tomto kontextu je rovněž zajímavé, že výše zmíněný vysokomolekulární protein jako potenciální složka ECM se jeví menší v kmeni BR-RF ve srovnání s více než 200 kDa velikostí proteinu v extraktu kolonií kmene BR-F. Je možné, že dochází k odlišným posttranslačním modifikacím projevujícím se rozdílnou mobilitou proteinů, a nebo i zde mohlo dojít k rekombinaci na genové úrovni. To by naznačovalo, že k podobným událostem může docházet v průběhu fenotypových přechodů s poměrně vysokou frekvencí. Z tohoto pohledu bude určitě zajímavá identifikace potenciálních cílů rekombinačních procesů, které by mohly být zdrojem variability určitých specifických vlastností (VERSTREPEN & FINK, 2009).

Přepínání fenotypů patogenních kvasinek je rovněž charakteristické změnami v expresi celé řady genů (SOLL, 2002; SRIKANTHA et al., 2005). Rovněž při domestikaci přírodního kmene BR-F a reverzním procesu, v průběhu kterého zpětně vznikají strukturované varianty, dochází k masivním změnám v genové expresi (KUTHAN et al., 2003). Transkriptomové srovnání výše popsaných variant vznikajících v průběhu fenotypových přechodů přírodního kmene BR-F nám umožnilo identifikaci genů, jejichž exprese je specifická pro daný morfotyp kolonie, tedy strukturovaný (reprezentovaný kmeny BR-F a BR-RF) na jedné straně a hladký (reprezentovaný kmenem BR-S) na straně druhé (kap. 5.4.). Byť není bez podrobnější deleční analýzy možné jednoznačně určit jaké změny v genové expresi jsou příčinou a jaké důsledkem uvedených fenotypových změn (GRANEK & MAGWENE, 2010), lze konstatovat, že ve strukturovaných variantách dochází ke zvýšené expresi transponovatelných elementů, expresi genů, které mohou souviset s odlišnostmi v buněčné stěně či se sekrecí GPI-proteinů, které zásadním způsobem mohou ovlivňovat například adhezivní vlastnosti buněk (DRANGINIS et al., 2007), či produkci a složení ECM. Zřejmé také je, v hladkých koloniích dochází ke zvýšené expresi řady stresových genů (kap. 5.4.). Spekulujme, že důvodem takových změn je zejména nepřítomnost nákladných ochranných mechanismů, které jsou typické pro strukturované kolonie (kap. 5.3.). Transkriptomové srovnání ovšem rovněž ukazuje na značné rozdíly i mezi jednotlivými morfologicky podobnými, avšak částečně odlišnými (viz výše), fenotypy. Vedle expresních změn řady metabolických genů svědčících o různé fázi vývoje z hlediska metabolické adaptace kolonií (PALKOVÁ et al., 2002), je možné značnou část genů specificky exprimovaných v koloniích přírodního kmene BR-F lokalizovat do tzv. HAST domén (kap 5.4.). Tyto často subtelomerické oblasti chromozomů jsou pod kontrolou specifické deacetylasy Hda1p (ROBYR et al., 2002). Tento enzym způsobuje

modifikací histonů represi transkripce genů v určitých oblastech chromozomů a reprezentuje tak epigenetický mechanismus regulace genové exprese zvaný transkripční umlčování (RUNDLETT et al., 1996). Geny nacházejících se v HAST doménách jsou za normálních okolností reprimovány, k jejich expresi pak často dochází v reakci na určité stresové podmínky či při růstu na ne zcela standardních médiích (ROBYR et al., 2002). Mezi geny exprimované v koloniích kmene BR-F, jež se nacházejí ve zmíněných oblastech patří zejména řada genů kódujících glukosidasy, tedy enzymy účastnící se metabolismu komplexních sacharidů a geny kódující proteiny buněčné stěny s často neznámou funkcí. Delece *HDA1* v kmeni BR-S sice nezpůsobuje změny v morfologii kolonie (geny specifické pro strukturované kolonie se v HAST doménách nenacházejí), vede však například ke zvýšení rezistence na calcofluor a lepší růst při vyšší teplotě, fenotyp, který je charakteristický pro kmen BR-F (kap. 5.4.). Calcofluor interferuje s tvorbou buněčné stěny kvasinek (RONCERO & DURAN, 1985) a řada mutant v genech, jejichž produkty ovlivňují sestavování a strukturu buněčné stěny, vykazuje hypersenzitivitu vůči calcofluoru (RAM et al., 1994). Alespoň určité fenotypové vlastnosti kmene BR-F by tak mohly být důsledkem vypnutí mechanismů transkripčního umlčování regulovaných specifickou deacetylasou Hda1p, což se projevuje mimojiné expresí genů způsobujících změny ve složení buněčné stěny. Je také známo, že Hda1p se rovněž podílí na epigenetické regulaci genu *FLO11* (HALME et al., 2004). Vzhledem k tomu, že *FLO11* je exprimován v obou strukturovaných variantách, tedy i v koloniích kmene BR-RF, kde nedochází ke zvýšené expresi genů nacházejících se v HAST doménách (kap. 5.4.), však není zřejmé zda Hda1p ovlivňuje rovněž expresi *FLO11* ve strukturovaných koloniích. Absence deacetylasy Hda1p způsobuje významné zvýšení frekvence přechodů z „white“ na „opaque“ při tzv. WO-1 přepínání fenotypů u některých kmenů *C. albicans* (KLAR et al., 2001). Byť funkce Hda1p pravděpodobně nespočívá přímo v represi genů specifických pro určitý fenotyp (SRIKANTHA et al., 2001), je zřejmé, že disponuje potenciálem k regulaci přechodů mezi různými fenotypy. Geny exprimované specificky v kmeni BR-RF jsou lokalizované ve zvýšené míře na úzkých oblastech dvou chromozomů (kap. 5.4.). Spekulujme, že k takovým expresním změnám může docházet vlivem určitých chromozomálních translokací či duplikací, ke kterým dochází v průběhu přepínání z domestikovaného kmene. Při přepínání fenotypů u *C. neoformans* rovněž často dochází ke změnám v uspořádání DNA a nestabilitě karyotypu (FRIES et al., 1999). Nezdá se však, že by tyto změny byly nějak zodpovědné za samotné přepínání (JAIN et al., 2006). Je spíše možné, že jsou vedlejším produktem mechanismů způsobujících zvýšení rekombinačních procesů.

Tvorba strukturovaných kolonií je preferovaným životním stylem přírodních kmenů v nepříznivých podmínkách a je, podobně jako jejich domestikace, indukována a modulována faktory vnějšího prostředí. Byť zatím není zřejmé, jakým mechanismem přímo dochází k regulaci vzniku strukturovaných kolonií, lze uvažovat roli transkripčního umlčování vlivem jiných deacetylas či jejich různých kombinací. Například delece genu *SIR2*, který kóduje deacetylasu zodpovědnou v *S. cerevisiae* za umlčování genů v subtelomerických oblastech, párovacích lokusů a rDNA (RUSCHE et al., 2003), vede k opakovanému vzniku mnoha morfologicky odlišných typů kolonií u *C. albicans* (PEREZ-MARTIN et al., 1999). Funkce Sir2p je poměrně pleiotropní, kdy vedle represe určitých genů může rovněž inhibovat rekombinační procesy (GOTTSCHLING, 2000). Vznik morfologicky heterogenních fenotypů kmenů *C. albicans* je rovněž provázen značnými karyotypovými změnami, které mohou být produktem absence Sir2p (PEREZ-MARTIN et al., 1999). Zajímavé je, že mezi velkým počtem genů s neznámou funkcí, jejichž exprese je zvýšená v kmenech tvořících strukturované kolonie (tedy BR-F i BR-RF) se nachází určitý počet genů, které jsou lokalizovány v subtelomerických oblastech. Vedle toho naše data rovněž prokazují, že v průběhu fenotypových přechodů může docházet k určitým rekombinačním událostem (viz výše) (kap. 5.4.). Objasnění úlohy Sir2p či dalších deacetylas při přepínání fenotypů přírodních kmenů a tvorbě strukturovaných kolonií však zůstává prozatím nezodpovězenou otázkou a důležitou budoucí výzvou.

Potenciál přírodních kmenů *S. cerevisiae* ke změnám ve fenotypu je tedy poměrně rozsáhlý. Mechanismů a faktorů účastnících se přechodů mezi různými fenotypy může být více a jejich komplexní definice nemusí být snadná. Zřejmé ovšem je, že modulace fenotypu v závislosti na vnějších faktorech je typickou vlastností přírodních kmenů sloužící k efektivní adaptaci na specifické podmínky prostředí.

7. Závěr

Typickou vlastností přírodních kmenů kvasinek *S. cerevisiae* je tvorba strukturovaných kolonií, značná fenotypová variabilita a schopnost v závislosti na vnějších podmínkách svůj fenotyp podle potřeby modulovat. Studium vzniku, vývoje a vlastností strukturovaných kolonií několika různých kmenů, jímž se zabývala tato práce, lze shrnout do několika následujících odstavců:

Při růstu určitých kmenů *S. cerevisiae* může docházet k aktivní agregaci sousedních populací za vzniku jednotné početnější komunity. Pro sjednocení sousedních mikrokolonií je využíván orientovaný vláknitý růst, který není odpovědí buněk na hladovění, nýbrž specifickým vývojovým programem. Tento proces není závislý na přítomnosti adhezinu Flo11p a je indukovatelný amoniakem, což naznačuje funkci této signální molekuly při synchronizaci raných fází populačního vývoje.

Vznik specifické trojrozměrné architektury kolonií je závislý na přítomnosti adhezivního proteinu Flo11p. Jeho exprese koreluje se strukturální komplexitou kolonií, je lokalizován na periferii buněk často nezávisle na jejich morfologii a jeho funkce pravděpodobně spočívá v participaci na tvorbě mezibuněčných spojů zajišťujících stabilitu a flexibilitu celého útvaru. Svou roli Flo11p rovněž plní při adhezi buněk a kolonií k substrátu.

Morfologie buněk, polarita jejich pučení a schopnost vláknitého růstu překvapivě nejsou klíčovými faktory obecně ovlivňujícími vznik strukturovaných kolonií. Schopnost vláknitého růstu je specifickou vlastností určitých kmenů a může vykazovat odlišné vlastnosti a plnit odlišné funkce i v různých fázích vývoje populace jednoho kmene. Jako příklad specifických funkcí vláknitého růstu slouží již zmíněné srůstání populací kmene ∑1278b a odlišně regulovaná modulace růstu při vertikální expanzi takové kolonie, či tvorba podpovrchové struktury ukotvující kolonii k substrátu u přírodního kmene BR-F.

Vývoj strukturované kolonie je spojen se značnou diferenciací buněčných populací, které se podílejí na ochraně společenství. Buňky v okrajových částech kolonie jsou vybaveny membránovými proteiny schopnými odstraňovat toxické látky z prostředí a podílejí se tak na ochraně celého společenství. Komplementární ochranný mechanismus představuje selektivně propustná extracelulární hmota bránící průniku některých látek. ECM je rovněž obecným rysem strukturovaných kolonii, kdy vedle ochranné funkce slouží také jako důležitý strukturní element zásadním způsobem ovlivňující tvar a vnitřní strukturu kolonie.

Nalezli jsme podmínky, při kterých dochází ke změně fenotypu části populace jinak stabilního domestikovaného kmene BR-S a obnovení schopnosti tvorby strukturovaných

kolonií. Potenciál fenotypových změn je ovšem širší, a byť dochází k obnovení řady vlastností, které jsou nezbytné pro tvorbu strukturovaných kolonií, v řadě jiných vlastností se „zdivočelé“ kmeny svými vlastnostmi mohou od původního přírodního kmene lišit. Tento soubor fenotypových přechodů nám rovněž umožnil identifikaci genů specificky exprimovaných ve strukturovaných koloniích a genů zodpovědných za určité vlastnosti původního přírodního kmene BR-F. Projevy těchto vlastností mohou být regulovány mechanismy transkripčního umlčování za účasti specifických histonových deacetylas.

8. Seznam citované literatury

Aguilar, C., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. 2007. Thinking about Bacillus subtilis as a multicellular organism. *Curr Opin Microbiol*. 10:638-43.

Al-Dhaheri, R.S., Douglas, L.J. 2010. Apoptosis in Candida biofilms exposed to amphotericin B. *J Med Microbiol*. 59:149-57.

Al-Fattani, M.A., Douglas, L.J. 2004. Penetration of Candida biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:3291-7.

Al-Fattani, M.A., Douglas, L.J. 2006. Biofilm matrix of Candida albicans and Candida tropicalis: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 55:999-1008.

Alby, K., Bennett, R.J. 2009a. Stress-induced phenotypic switching in Candida albicans. *Mol Biol Cell*. 20:3178-91.

Alby, K., Bennett, R.J. 2009b. To switch or not to switch?: Phenotypic switching is sensitive to multiple inputs in a pathogenic fungus. *Commun Integr Biol*. 2:509-11.

Alem, M.A., Oteef, M.D., Flowers, T.H., Douglas, L.J. 2006. Production of tyrosol by Candida albicans biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell*. 5:1770-9.

Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. 2006. A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. *Mol Microbiol*. 59:1114-28.

Annous, B.A., Fratamico, P.M., Smith, J.L. 2009. Scientific status summary; Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do. *J Food Sci*. 74:R24-37.

Ashbee, H.R., Bignell, E.M. 2009. Pathogenic yeasts. Springer, Berlin. 365 p. pp.

Austin, J.W., Sanders, G., Kay, W.W., Collinson, S.K. 1998. Thin aggregative fimbriae enhance Salmonella enteritidis biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*. 162:295-301.

Azakami, H., Nakashima, H., Akimichi, H., Noiri, Y., Ebisu, S., Kato, A. 2006. Involvement of N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin in biofilm formation by the periodontopathogenic bacterium, Eikenella corrodens. *Biosci Biotechnol Biochem*. 70:441-6.

Baillie, G.S., Douglas, L.J. 1998. Effect of growth rate on resistance of Candida albicans biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 42:1900-5.

Baillie, G.S., Douglas, L.J. 1999. Role of dimorphism in the development of Candida albicans biofilms. *J Med Microbiol*. 48:671-9.

Baillie, G.S., Douglas, L.J. 2000. Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*. 46:397-403.

Balzi, E., Chen, W., Ulaszewski, S., Capieaux, E., Goffeau, A. 1987. The multidrug resistance gene PDR1 from Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem*. 262:16871-9.

Barrales, R.R., Jimenez, J., Ibeas, J.I. 2008. Identification of novel activation mechanisms for FLO11 regulation in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*. 178:145-56.

Bauer, F.F., Govender, P., Bester, M.C. 2010. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 88:31-9.

Bauer, J., Wendland, J. 2007. Candida albicans Sfl1 suppresses flocculation and filamentation. *Eukaryot Cell*. 6:1736-44.

Bayles, K.W. 2007. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 5:721-6.

Bayly, J.C., Douglas, L.M., Pretorius, I.S., Bauer, F.F., Dranginis, A.M. 2005. Characteristics of Flo11-dependent flocculation in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Res*. 5:1151-6.

Beauvais, A., Loussert, C., Prevost, M.C., Verstrepen, K., Latge, J.P. 2009. Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in FLO1-expressing Saccharomyces cerevisiae cells. *FEMS Yeast Res*. 9:411-9.

Begun, J., Gaiani, J.M., Rohde, H., Mack, D., Calderwood, S.B., Ausubel, F.M., Sifri, C.D. 2007. Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against Caenorhabditis elegans immune defenses. *PLoS Pathog*. 3:e57.

Ben-Jacob, E., Cohen, I., Gutnick, D.L. 1998. Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. *Annu Rev Microbiol*. 52:779-806.

Biswas, S., Van Dijck, P., Datta, A. 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of Candida albicans. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71:348-76.

Blankenship, J.R., Mitchell, A.P. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 9:588-94.

Bokranz, W., Wang, X., Tschape, H., Romling, U. 2005. Expression of cellulose and curli fimbriae by Escherichia coli isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol*. 54:1171-82.

Boles, B.R., Horswill, A.R. 2008. Agr-mediated dispersal of Staphylococcus aureus biofilms. *PLoS Pathog*. 4:e1000052.

Branda, S.S., Gonzalez-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R. 2001. Fruiting body formation by Bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11621-6.

Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R., Kolter, R. 2006. A major protein component of the Bacillus subtilis biofilm matrix. *Mol Microbiol*. 59:1229-38.

Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 13:20-6.

Braus, G.H., Grundmann, O., Bruckner, S., Mosch, H.U. 2003. Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and FLO11 gene expression in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*. 14:4272-84.

Brückner, S., Mösch, H.U. 2011. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiol Rev*. 36:25-58.

Cao, Y.Y., Cao, Y.B., Xu, Z., Ying, K., Li, Y., Xie, Y., Zhu, Z.Y., Chen, W.S., Jiang, Y.Y. 2005. cDNA microarray analysis of differential gene expression in Candida albicans biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother*. 49:584-9.

Casalone, E., Barberio, C., Cappellini, L., Polsinelli, M. 2005. Characterization of Saccharomyces cerevisiae natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. *Res Microbiol*. 156:191-200.

Cavalieri, D., Townsend, J.P., Hartl, D.L. 2000. Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of Saccharomyces cerevisiae revealed by DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:12369-74.

Clemons, K.V., Hanson, L.C., Stevens, D.A. 1996. Colony phenotype switching in clinical and non-clinical isolates of Saccharomyces cerevisiae. *J Med Vet Mycol*. 34:259-64.

Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C., Parsek, M.R. 2011. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of Pseudomonas aeruginosa. *PLoS Pathog*. 7:e1001264.

Costerton, J.W. 1999. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 11:217-21; discussion 237-9.

Crespi, B.J. 2001. The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol Evol*. 16:178-183.

Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R. 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus. *Infect Immun*. 72:2177-85.

Cullen, P.J., Sprague, G.F., Jr. 2002. The roles of bud-site-selection proteins during haploid invasive growth in yeast. *Mol Biol Cell*. 13:2990-3004.

D'Argenio, D.A., Calfee, M.W., Rainey, P.B., Pesci, E.C. 2002. Autolysis and autoaggregation in Pseudomonas aeruginosa colony morphology mutants. *J Bacteriol*. 184:6481-9.

d'Enfert, C. 2006. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic Candida to antifungal agents. *Curr Drug Targets*. 7:465-70.

D'Souza, C.A., Heitman, J. 2001. It infects me, it infects me not: phenotypic switching in the fungal pathogen Cryptococcus neoformans. *J Clin Invest*. 108:1577-8.

Dao, D.N., Kessin, R.H., Ennis, H.L. 2000. Developmental cheating and the evolutionary biology of Dictyostelium and Myxococcus. *Microbiology*. 146 (Pt 7):1505-12.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280:295-8.

Dawson, C.C., Intapa, C., Jabra-Rizk, M.A. 2011. "Persisters": survival at the cellular level. *PLoS Pathog*. 7:e1002121.

Di Bonaventura, G., Pompilio, A., Picciani, C., Iezzi, M., D'Antonio, D., Piccolomini, R. 2006. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen Trichosporon asahii: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:3269-76.

Dickinson, J.R. 1996. 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology*. 142:1391-7.

Donlan, R.M. 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 7:277-81.

Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 8:881-90.

Donlan, R.M., Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 15:167-93.

Douglas, L.J. 2003. Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 11:30-6.

Douglas, L.M., Li, L., Yang, Y., Dranginis, A.M. 2007. Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a Saccharomyces cerevisiae mannoprotein with homotypic properties of adhesion. *Eukaryot Cell*. 6:2214-21.

Dranginis, A.M., Rauceo, J.M., Coronado, J.E., Lipke, P.N. 2007. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71:282-94.

Dunne, W.M., Jr. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 15:155-66.

Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C., Stewart, G.S., Christiansen, G., Chhabra, S.R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S., Givskov, M. 1996. Involvement of N-acyl-L-hormoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of Serratia liquefaciens. *Mol Microbiol*. 20:127-36.

Elias, S., Banin, E. 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*.

Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hazan, R. 2006. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet*. 2:e135.

Engelberg, D., Mimran, A., Martinetto, H., Otto, J., Simchen, G., Karin, M., Fink, G.R. 1998. Multicellular stalk-like structures in Saccharomyces cerevisiae. *J Bacteriol*. 180:3992-6.

Espinosa-Urgel, M., Salido, A., Ramos, J.L. 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of Pseudomonas putida to seeds. *J Bacteriol*. 182:2363-9.

Esteve-Zarzoso, B., Peris-Toran, M.J., Garcia-Maiquez, E., Uruburu, F., Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl Environ Microbiol*. 67:2056-61.

Fidalgo, M., Barrales, R.R., Ibeas, J.I., Jimenez, J. 2006. Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:11228-33.

Fidalgo, M., Barrales, R.R., Jimenez, J. 2008. Coding repeat instability in the FLO11 gene of Saccharomyces yeasts. *Yeast*. 25:879-89.

Flemming, H.C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 8:623-33.

Foster, K.R. 2010. Social behaviour in microorganisms. *In* Social behaviour : genes, ecology and evolution. T. Székely, A.J. Moore, and J. Komdeur, editors. Cambridge University Press, Cambridge ; New York. 331-356.

Franca, E.J., Andrade, C.G., Furlaneto-Maia, L., Serpa, R., Oliveira, M.T., Quesada, R.M., Furlaneto, M.C. 2011. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of a clinical strain of Candida tropicalis and biofilm formation by variant phenotypes. *Micron*. 42:726-32.

Fraser, G.M., Hughes, C. 1999. Swarming motility. *Curr Opin Microbiol*. 2:630-5.

Friedman, L., Kolter, R. 2004. Genes involved in matrix formation in Pseudomonas aeruginosa PA14 biofilms. *Mol Microbiol*. 51:675-90.

Fries, B.C., Goldman, D.L., Casadevall, A. 2002. Phenotypic switching in Cryptococcus neoformans. *Microbes Infect*. 4:1345-52.

Fries, B.C., Goldman, D.L., Cherniak, R., Ju, R., Casadevall, A. 1999. Phenotypic switching in Cryptococcus neoformans results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infect Immun*. 67:6076-83.

Fries, B.C., Taborda, C.P., Serfass, E., Casadevall, A. 2001. Phenotypic switching of Cryptococcus neoformans occurs in vivo and influences the outcome of infection. *J Clin Invest*. 108:1639-48.

Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 176:269-75.

Furukawa, K., Sidoux-Walter, F., Hohmann, S. 2009. Expression of the yeast aquaporin Aqy2 affects cell surface properties under the control of osmoregulatory and morphogenic signalling pathways. *Mol Microbiol*. 74:1272-86.

Gancedo, J.M. 2001. Control of pseudohyphae formation in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiol Rev*. 25:107-23.

Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M., d'Enfert, C. 2004. Candida albicans biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell*. 3:536-45.

Garcia, M.C., Lee, J.T., Ramsook, C.B., Alsteens, D., Dufrene, Y.F., Lipke, P.N. 2011. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. *PLoS One*. 6:e17632.

Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F., Velasco, R. 2008. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J Agric Food Chem*. 56:11773-85.

Ghannoum, M.A., O'Toole, G.A. 2004. Microbial biofilms. ASM Press, Washington, D.C. 426 p. pp.

Giltner, C.L., van Schaik, E.J., Audette, G.F., Kao, D., Hodges, R.S., Hassett, D.J., Irvin, R.T. 2006. The Pseudomonas aeruginosa type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol Microbiol*. 59:1083-96.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., Fink, G.R. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast S. cerevisiae lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*. 68:1077-90.

Goldman, D.L., Fries, B.C., Franzot, S.P., Montella, L., Casadevall, A. 1998. Phenotypic switching in the human pathogenic fungus Cryptococcus neoformans is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:14967-72.

Gottschling, D.E. 2000. Gene silencing: two faces of SIR2. *Curr Biol*. 10:R708-11.

Gow, N.A., Brown, A.J., Odds, F.C. 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*. 5:366-71.

Granek, J.A., Kayikci, O., Magwene, P.M. 2011. Pleiotropic signaling pathways orchestrate yeast development. *Curr Opin Microbiol*. 14:676-81.

Granek, J.A., Magwene, P.M. 2010. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genet*. 6:e1000823.

Grilione, P.L., Pangborn, J. 1975. Scanning electron microscopy of fruiting body formation by myxobacteria. *J Bacteriol*. 124:1558-65.

Gross, J.D., Bradbury, J., Kay, R.R., Peacey, M.J. 1983. Intracellular pH and the control of cell differentiation in Dictyostelium discoideum. *Nature*. 303:244-5.

Guerrero, A., Jain, N., Goldman, D.L., Fries, B.C. 2006. Phenotypic switching in Cryptococcus neoformans. *Microbiology*. 152:3-9.

Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., Fink, G.R. 2000. A Saccharomyces gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:12158-63.

Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C., Fink, G.R. 2004. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell*. 116:405-15.

Hammer, B.K., Bassler, B.L. 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in Vibrio cholerae. *Mol Microbiol*. 50:101-4.

Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K.A., Maldener, C., Frohlich, K.U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., Madeo, F. 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol*. 164:501-7.

Herman, P.K. 2002. Stationary phase in yeast. *Curr Opin Microbiol*. 5:602-7.

Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L., O'Toole, G.A. 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by Pseudomonas fluorescens WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol*. 49:905-18.

Hogan, D.A. 2006. Quorum sensing: alcohols in a social situation. *Curr Biol*. 16:R457-8.

Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K.W. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus Candida albicans is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 67:2982-92.

Hunt, S.M., Werner, E.M., Huang, B., Hamilton, M.A., Stewart, P.S. 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Appl Environ Microbiol*. 70:7418-25.

Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 183:5385-94.

Chandra, J., Zhou, G., Ghannoum, M.A. 2005. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets*. 6:887-94.

Chavel, C.A., Dionne, H.M., Birkaya, B., Joshi, J., Cullen, P.J. 2010. Multiple signals converge on a differentiation MAPK pathway. *PLoS Genet*. 6:e1000883.

Chen, H., Fink, G.R. 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev*. 20:1150-61.

Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., Fink, G.R. 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in Candida albicans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:5048-52.

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., Hughson, F.M. 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*. 415:545-9.

Cho, H., Jonsson, H., Campbell, K., Melke, P., Williams, J.W., Jedynak, B., Stevens, A.M., Groisman, A., Levchenko, A. 2007. Self-organization in high-density bacterial colonies: efficient crowd control. *PLoS Biol*. 5:e302.

Ichikawa, T., Sugita, T., Wang, L., Yokoyama, K., Nishimura, K., Nishikawa, A. 2004. Phenotypic switching and beta-N-acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast Trichosporon asahii. *Microbiol Immunol*. 48:237-42.

Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., Iimura, Y. 2004. FLO11 is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of NRG1 in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiol Lett*. 237:425-30.

Jain, N., Guerrero, A., Fries, B.C. 2006. Phenotypic switching and its implications for the pathogenesis of Cryptococcus neoformans. *FEMS Yeast Res*. 6:480-8.

Jain, N., Hasan, F., Fries, B.C. 2008. Phenotypic Switching in Fungi. *Curr Fungal Infect Rep*. 2:180-188.

Jarrett, C.O., Deak, E., Isherwood, K.E., Oyston, P.C., Fischer, E.R., Whitney, A.R., Kobayashi, S.D., DeLeo, F.R., Hinnebusch, B.J. 2004. Transmission of Yersinia pestis from an infectious biofilm in the flea vector. *J Infect Dis*. 190:783-92.

Jones, S., White, G., Hunter, P.R. 1994. Increased phenotypic switching in strains of Candida albicans associated with invasive infections. *J Clin Microbiol*. 32:2869-70.

Joshi, K.R., Gavin, J.B. 1975. The morphology of colony variants of three species of Candida. *Sabouraudia*. 13:274-9.

Kaiser, D. 1986. Control of multicellular development: Dictyostelium and Myxococcus. *Annu Rev Genet*. 20:539-66.

Karunanithi, S., Vadaie, N., Chavel, C.A., Birkaya, B., Joshi, J., Grell, L., Cullen, P.J. 2010. Shedding of the mucin-like flocculin Flo11p reveals a new aspect of fungal adhesion regulation. *Curr Biol*. 20:1389-95.

Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M.L., Cormack, B.P. 2005. A yeast by any other name: Candida glabrata and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol*. 8:378-84.

Klar, A.J., Srikantha, T., Soll, D.R. 2001. A histone deacetylation inhibitor and mutant promote colony-type switching of the human pathogen Candida albicans. *Genetics*. 158:919-24.

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T. 2003. Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol*. 48:1511-24.

Kline, K.A., Falker, S., Dahlberg, S., Normark, S., Henriques-Normark, B. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*. 5:580-92.

Klis, F.M., Sosinska, G.J., de Groot, P.W., Brul, S. 2009. Covalently linked cell wall proteins of Candida albicans and their role in fitness and virulence. *FEMS Yeast Res*. 9:1013-28.

Kocková-Kratochvílová, A., Sláviková, E., Kovačovská, R. 1988. Yeasts isolated from fruitbodies of mushrooms of the Lowland Záhorie. *Czech Mycology*. 42:114-121.

Kolter, R. 2010. Biofilms in lab and nature: a molecular geneticist's voyage to microbial ecology. *Int Microbiol*. 13:1-7.

Kron, S.J. 1997. Filamentous growth in budding yeast. *Trends Microbiol*. 5:450-4.

Kuchin, S., Vyas, V.K., Carlson, M. 2002. Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol*. 22:3994-4000.

Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., Palková, Z. 2003. Domestication of wild Saccharomyces cerevisiae is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol Microbiol*. 47:745-54.

Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., Kjelleberg, S. 2004. Quorum sensing-controlled biofilm development in Serratia liquefaciens MG1. *J Bacteriol*. 186:692-8.

Laffey, S.F., Butler, G. 2005. Phenotype switching affects biofilm formation by Candida parapsilosis. *Microbiology*. 151:1073-81.

LaFleur, M.D., Kumamoto, C.A., Lewis, K. 2006. Candida albicans biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:3839-46.

Lachke, S.A., Joly, S., Daniels, K., Soll, D.R. 2002. Phenotypic switching and filamentation in Candida glabrata. *Microbiology*. 148:2661-74.

Lewis, K. 2008. Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells. *In* Bacterial Biofilms. T. Romeo, editor. Springer, New York. 107-132.

Lewis, K. 2010. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*. 64:357-72.

Li, F., Palecek, S.P. 2003. EAP1, a Candida albicans gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell*. 2:1266-73.

Li, F., Svarovsky, M.J., Karlsson, A.J., Wagner, J.P., Marchillo, K., Oshel, P., Andes, D., Palecek, S.P. 2007. Eap1p, an adhesin that mediates Candida albicans biofilm formation in vitro and in vivo. *Eukaryot Cell*. 6:931-9.

Liu, H., Fang, H.H. 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J Biotechnol*. 95:249-56.

Lo, W.S., Dranginis, A.M. 1998. The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*. 9:161-71.

Lockhart, S.R., Pujol, C., Daniels, K.J., Miller, M.G., Johnson, A.D., Pfaller, M.A., Soll, D.R. 2002. In Candida albicans, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics*. 162:737-45.

Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R. 2010. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2:a000398.

Lopez, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. 2009a. Cannibalism enhances biofilm development in Bacillus subtilis. *Mol Microbiol*. 74:609-18.

Lopez, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. 2009b. Paracrine signaling in a bacterium. *Genes Dev*. 23:1631-8.

Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J. 2009. Assembly and development of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix. *PLoS Pathog*. 5:e1000354.

Markx, G.H., Andrews, J.S., Mason, V.P. 2004. Towards microbial tissue engineering? *Trends Biotechnol*. 22:417-22.

Martinez, L.R., Casadevall, A. 2006. Susceptibility of Cryptococcus neoformans biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:1021-33.

Martins, M., Henriques, M., Lopez-Ribot, J.L., Oliveira, R. 2012. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against Candida albicans biofilms. *Mycoses*. 55:80-5.

Martins, M., Uppuluri, P., Thomas, D.P., Cleary, I.A., Henriques, M., Lopez-Ribot, J.L., Oliveira, R. 2010. Presence of extracellular DNA in the Candida albicans biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia*. 169:323-31.

Marvasi, M., Visscher, P.T., Casillas Martinez, L. 2010. Exopolymeric substances (EPS) from Bacillus subtilis: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol Lett*. 313:1-9.

Masuoka, J., Hazen, K.C. 1997. Cell wall protein mannosylation determines Candida albicans cell surface hydrophobicity. *Microbiology*. 143:3015-21.

Masy, C.L., Henquinet, A., Mestdagh, M.M. 1992. Flocculation of Saccharomyces cerevisiae: inhibition by sugars. *Can J Microbiol*. 38:1298-306.

Mateus, C., Crow, S.A., Jr., Ahearn, D.G. 2004. Adherence of Candida albicans to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:3358-66.

Melo, L.F. 2005. Biofilm physical structure, internal diffusivity and tortuosity. *Water Science & Technology*. 52:77-84.

Miller, M.B., Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 55:165-99.

Mináriková, L., Kuthan, M., Řičicová, M., Forstová, J., Palková, Z. 2001. Differentiated gene expression in cells within yeast colonies. *Exp Cell Res*. 271:296-304.

Mino, T. 2000. Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochemistry (Mosc)*. 65:341-8.

Morschhäuser, J. 2010. Regulation of white-opaque switching in Candida albicans. *Med Microbiol Immunol*. 199:165-72.

Mortimer, R.K., Johnston, J.R. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics*. 113:35-43.

Mukherjee, P.K., Chandra, J., Kuhn, D.M., Ghannoum, M.A. 2003. Mechanism of fluconazole resistance in Candida albicans biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun*. 71:4333-40.

Nadell, C.D., Xavier, J.B., Levin, S.A., Foster, K.R. 2008. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biol*. 6:e14.

Nakagawa, Y., Toda, Y., Yamamura, H., Hayakawa, M., Iimura, Y. 2011. FLO11 is essential for pellicle formation by wild pellicle-forming yeasts isolated from contaminated wines. *J Biosci Bioeng*. 111:7-9.

Nariya, H., Inouye, M. 2008. MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular Myxococcus development. *Cell*. 132:55-66.

Neiman, A.M. 2011. Sporulation in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*. 189:737-65.

Nett, J., Andes, D. 2006. Candida albicans biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol*. 9:340-5.

Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, K., Hoff, B., VanHandel, M., Andes, D. 2007. Putative role of beta-1,3 glucans in Candida albicans biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 51:510-20.

Nett, J.E., Sanchez, H., Cain, M.T., Andes, D.R. 2010. Genetic basis of Candida biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis*. 202:171-5.

Nett, J.E., Sanchez, H., Cain, M.T., Ross, K.M., Andes, D.R. 2011. Interface of Candida albicans biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryot Cell*. 10:1660-9.

Nobile, C.J., Mitchell, A.P. 2006. Genetics and genomics of Candida albicans biofilm formation. *Cell Microbiol*. 8:1382-91.

Nobile, C.J., Nett, J.E., Andes, D.R., Mitchell, A.P. 2006. Function of Candida albicans adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell*. 5:1604-10.

Nobile, C.J., Schneider, H.A., Nett, J.E., Sheppard, D.C., Filler, S.G., Andes, D.R., Mitchell, A.P. 2008. Complementary adhesin function in C. albicans biofilm formation. *Curr Biol*. 18:1017-24.

O'Gara, J.P. 2007. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiol Lett*. 270:179-88.

O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 54:49-79.

O'Toole, G.A., Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Mol Microbiol*. 30:295-304.

Oh, S.H., Cheng, G., Nuessen, J.A., Jajko, R., Yeater, K.M., Zhao, X., Pujol, C., Soll, D.R., Hoyer, L.L. 2005. Functional specificity of Candida albicans Als3p proteins and clade specificity of ALS3 alleles discriminated by the number of copies of the tandem repeat sequence in the central domain. *Microbiology*. 151:673-81.

Palková, Z. 2004. Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO Rep*. 5:470-6.

Palková, Z., Devaux, F., Řičicová, M., Mináriková, L., Le Crom, S., Jacq, C. 2002. Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell*. 13:3901-14.

Palková, Z., Forstová, J. 2000. Yeast colonies synchronise their growth and development. *J Cell Sci*. 113 (Pt 11):1923-8.

Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., Forstová, J. 1997. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*. 390:532-6.

Palková, Z., Váchová, L. 2003. Ammonia signaling in yeast colony formation. *Int Rev Cytol*. 225:229-72.

Palková, Z., Váchová, L. 2006. Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev*. 30:806-24.

Pappas, K.M., Weingart, C.L., Winans, S.C. 2004. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signalling. *Mol Microbiol*. 53:755-69.

Pavlova, K., Panchev, I., Hristozova, T. 2005. Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21:279-283.

Perez-Martin, J., Uria, J.A., Johnson, A.D. 1999. Phenotypic switching in Candida albicans is controlled by a SIR2 gene. *EMBO J*. 18:2580-92.

Pesti, M., Sipiczki, M., Pinter, Y. 1999. Scanning electron microscopy characterisation of colonies of Candida albicans morphological mutants. *J Med Microbiol*. 48:167-72.

Piccirillo, S., Honigberg, S.M. 2010. Sporulation patterning and invasive growth in wild and domesticated yeast colonies. *Res Microbiol*. 161:390-8.

Pomes, R., Gil, C., Nombela, C. 1985. Genetic analysis of Candida albicans morphological mutants. *J Gen Microbiol*. 131:2107-13.

Pratt, L.A., Kolter, R. 1998. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*. 30:285-93.

Purevdorj-Gage, B., Orr, M.E., Stoodley, P., Sheehan, K.B., Hyman, L.E. 2007. The role of FLO11 in Saccharomyces cerevisiae biofilm development in a laboratory based flow-cell system. *FEMS Yeast Res*. 7:372-9.

Radford, D.R., Challacombe, S.J., Walter, J.D. 1994. A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of Candida albicans. *J Med Microbiol*. 40:416-23.

Rainey, P.B., Beaumont, H.J., Ferguson, G.C., Gallie, J., Kost, C., Libby, E., Zhang, X.X. 2011. The evolutionary emergence of stochastic phenotype switching in bacteria. *Microb Cell Fact*. 10 Suppl 1:S14.

Ram, A.F., Wolters, A., Ten Hoopen, R., Klis, F.M. 1994. A new approach for isolating cell wall mutants in Saccharomyces cerevisiae by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast*. 10:1019-30.

Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T.F., Wickes, B.L., Lopez-Ribot, J.L. 2002a. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in Candida albicans biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 49:973-80.

Ramage, G., Martinez, J.P., Lopez-Ribot, J.L. 2006. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 6:979-86.

Ramage, G., Mowat, E., Williams, C., Lopez Ribot, J.L. 2010. Yeast Biofilms. *In* Pathogenic yeasts. H.R. Ashbee and E.M. Bignell, editors. Springer, Berlin. 121-144.

Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, M., Williams, C. 2012. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology*. 2012:1-14.

Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., Lopez-Ribot, J.L. 2002b. Inhibition of Candida albicans biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*. 68:5459-63.

Ramage, G., VandeWalle, K., Lopez-Ribot, J.L., Wickes, B.L. 2002c. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in Candida albicans. *FEMS Microbiol Lett*. 214:95-100.

Ramsook, C.B., Tan, C., Garcia, M.C., Fung, R., Soybelman, G., Henry, R., Litewka, A., O'Meally, S., Otoo, H.N., Khalaf, R.A., Dranginis, A.M., Gaur, N.K., Klotz, S.A., Rauceo, J.M., Jue, C.K., Lipke, P.N. 2010. Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell*. 9:393-404.

Raszka, A., Chorvatova, M., Wanner, J. 2006. The role and significance of extracellular polymers in activated sludge. Part I: Literature review. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 34:411-424.

Rauceo, J.M., De Armond, R., Otoo, H., Kahn, P.C., Klotz, S.A., Gaur, N.K., Lipke, P.N. 2006. Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the Candida albicans adhesin Als5p. *Eukaryot Cell*. 5:1664-73.

Redfield, R.J. 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol*. 10:365-70.

Reynolds, T.B., Fink, G.R. 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*. 291:878-81.

Rice, K.C., Mann, E.E., Endres, J.L., Weiss, E.C., Cassat, J.E., Smeltzer, M.S., Bayles, K.W. 2007. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in Staphylococcus aureus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:8113-8.

Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S.K., Wang, A., Suka, N., Grunstein, M. 2002. Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell*. 109:437-46.

Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczkowski, M., Carvajal, E., Balzi, E., Goffeau, A. 2001. The pleitropic drug ABC transporters from Saccharomyces cerevisiae. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 3:207-14.

Roncero, C., Duran, A. 1985. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol*. 163:1180-5.

Rosenberg, S.M. 2009. Life, death, differentiation, and the multicellularity of bacteria. *PLoS Genet*. 5:e1000418.

Ross, P., Mayer, R., Benziman, M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev*. 55:35-58.

Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B.M., Grunstein, M. 1996. HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:14503-8.

Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L., Rine, J. 2003. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in Saccharomyces cerevisiae. *Annu Rev Biochem*. 72:481-516.

Ryder, C., Byrd, M., Wozniak, D.J. 2007. Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Curr Opin Microbiol*. 10:644-8.

Sakuragi, Y., Kolter, R. 2007. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*. 189:5383-6.

Shapiro, J.A. 1992. Pattern and control in bacterial colony development. *Sci Prog*. 76:399-424.

Shapiro, J.A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol*. 52:81-104.

Sheng, G.P., Yu, H.Q., Yu, Z. 2005. Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas acidophila. *Appl Microbiol Biotechnol*. 67:125-30.

Shimkets, L.J. 1990. Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev*. 54:473-501.

Schaap, P., Konijn, T.M., van Haastert, P.J. 1984. cAMP pulses coordinate morphogenetic movement during fruiting body formation of Dictyostelium minutum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:2122-6.

Scherz, R., Shinder, V., Engelberg, D. 2001. Anatomical analysis of Saccharomyces cerevisiae stalk-like structures reveals spatial organization and cell specialization. *J Bacteriol*. 183:5402-13.

Sillankorva, S., Neubauer, P., Azeredo, J. 2008. Pseudomonas fluorescens biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *BMC Biotechnol*. 8:79.

Singh, R., Paul, D., Jain, R.K. 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol*. 14:389-97.

Sipos, G., Kuchler, K. 2006. Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification. *Curr Drug Targets*. 7:471-81.

Sláviková, E., Vadkertiová, R. 1995. Yeasts and yeast-like organisms isolated from fish-pond waters. *Acta Microbiol Pol*. 44:181-9.

Sláviková, E., Vadkertiová, R. 1997a. Seasonal occurrence of yeasts and yeast-like organisms in the river Danube. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 72:77-80.

Sláviková, E., Vadkertiová, R. 1997b. Yeasts and yeast-like organisms occuring in the river Morava. *Food Technol. Biotechnol.* 35:293-297.

Slutsky, B., Buffo, J., Soll, D.R. 1985. High-frequency switching of colony morphology in Candida albicans. *Science*. 230:666-9.

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., Soll, D.R. 1987. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in Candida albicans. *J Bacteriol*. 169:189-97.

Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., Vinces, M.D., Jansen, A., Prevost, M.C., Latge, J.P., Fink, G.R., Foster, K.R., Verstrepen, K.J. 2008. FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell*. 135:726-37.

Soll, D.R. 1992. High-frequency switching in Candida albicans. *Clin Microbiol Rev*. 5:183-203.

Soll, D.R. 2002. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop*. 81:101-10.

Soll, D.R. 2004. Mating-type locus homozygosis, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in Candida albicans. *Bioessays*. 26:10-20.

Sousa, A.M., Machado, I., Pereira, M.O. 2011. Phenotypic switching: an opportunity to bacteria thrive. *In* Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. A. Mendez-Vilas, editor. Formatex Research Center, Badajaz, Spain. 252-262.

Sprague, G.F., Jr., Winans, S.C. 2006. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes Dev*. 20:1045-9.

Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A.J., Soll, D.R. 2001. The histone deacetylase genes HDA1 and RPD3 play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in Candida albicans. *J Bacteriol*. 183:4614-25.

Srikantha, T., Tsai, L.K., Daniels, K., Soll, D.R. 2000. EFG1 null mutants of Candida albicans switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells. *J Bacteriol*. 182:1580-91.

Srikantha, T., Zhao, R., Daniels, K., Radke, J., Soll, D.R. 2005. Phenotypic switching in Candida glabrata accompanied by changes in expression of genes with deduced functions in copper detoxification and stress. *Eukaryot Cell*. 4:1434-45.

Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L., Sundstrom, P. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of Candida albicans Hwp1. *Science*. 283:1535-8.

Stanley, N.R., Lazazzera, B.A. 2005. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of Bacillus subtilis that affect poly-gamma-dl-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol Microbiol*. 57:1143-58.

Steinberger, R.E., Allen, A.R., Hansa, H.G., Holden, P.A. 2002. Elongation correlates with nutrient deprivation in Pseudomonas aeruginosa-unsaturates biofilms. *Microb Ecol*. 43:416-23.

Sudbery, P., Gow, N., Berman, J. 2004. The distinct morphogenic states of Candida albicans. *Trends Microbiol*. 12:317-24.

Sutherland, I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147:3-9.

Šťovíček, V., Váchová, L., Kuthan, M., Palková, Z. 2010. General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genet Biol*. 47:1012-22.

Šťovíček, V., Váchová, L., Palková, Z. 2012. Yeast biofilm colony as an orchestrated multicellular organism. *Commun Integr Biol*. 5:1-3.

Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.E. 2005. Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*. 151:1313-23.

Tokunaga, M., Kusamichi, M., Koike, H. 1986. Ultrastructure of outermost layer of cell wall in Candida albicans observed by rapid-freezing technique. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 35:237-46.

Váchová, L., Chernyavskiy, O., Strachotová, D., Bianchini, P., Burdíková, Z., Ferčíková, I., Kubínová, L., Palková, Z. 2009. Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ Microbiol*. 11:1866-77.

Váchová, L., Palková, Z. 2005. Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol*. 169:711-7.

Váchová, L., Šťovíček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubínová, L., Palková, Z. 2011. Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *J Cell Biol*. 194:679-87.

Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.M., Amorena, B., Penades, J.R., Lasa, I. 2003. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol*. 48:1075-87.

Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., Filloux, A. 2001. The chaperone/usher pathways of Pseudomonas aeruginosa: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:6911-6.

van der Woude, M.W. 2006. Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiol Lett*. 254:190-7.

Van Mulders, S.E., Christianen, E., Saerens, S.M., Daenen, L., Verbelen, P.J., Willaert, R., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R. 2009. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Res*. 9:178-90.

van Schaik, E.J., Giltner, C.L., Audette, G.F., Keizer, D.W., Bautista, D.L., Slupsky, C.M., Sykes, B.D., Irvin, R.T. 2005. DNA binding: a novel function of Pseudomonas aeruginosa type IV pili. *J Bacteriol*. 187:1455-64.

Veelders, M., Bruckner, S., Ott, D., Unverzagt, C., Mosch, H.U., Essen, L.O. 2010. Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:22511-6.

Velicer, G.J., Kroos, L., Lenski, R.E. 1998. Loss of social behaviors by myxococcus xanthus during evolution in an unstructured habitat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:12376-80.

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F.R. 2003. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol*. 61:197-205.

Verstrepen, K.J., Fink, G.R. 2009. Genetic and epigenetic mechanisms underlying cell-surface variability in protozoa and fungi. *Annu Rev Genet*. 43:1-24.

Verstrepen, K.J., Klis, F.M. 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*. 60:5-15.

Verstrepen, K.J., Reynolds, T.B., Fink, G.R. 2004. Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol*. 2:533-40.

Vilain, S., Pretorius, J.M., Theron, J., Brozel, V.S. 2009. DNA as an adhesin: Bacillus cereus requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 75:2861-8.

Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., Kolter, R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev*. 22:945-53.

Vopálenská, I., Hůlková, M., Janderová, B., Palková, Z. 2005. The morphology of Saccharomyces cerevisiae colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. *Res Microbiol*. 156:921-31.

Vopálenská, I., Šťovíček, V., Janderová, B., Váchová, L., Palková, Z. 2010. Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environ Microbiol*. 12:264-77.

Wai, S.N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S.I., Yoshida, S.I. 1998. Vibrio cholerae O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 64:3648-55.

Wang, X., Preston, J.F., 3rd, Romeo, T. 2004. The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol*. 186:2724-34.

Wartmann, T., Erdmann, J., Kunze, I., Kunze, G. 2000. Morphology-related effects on gene expression and protein accumulation of the yeast Arxula adeninivorans LS3. *Arch Microbiol*. 173:253-61.

Watnick, P.I., Kolter, R. 1999. Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm. *Mol Microbiol*. 34:586-95.

Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B., Stewart, P.S. 2004. Stratified growth in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 70:6188-96.

White, A.P., Gibson, D.L., Kim, W., Kay, W.W., Surette, M.G. 2006. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of Salmonella. *J Bacteriol*. 188:3219-27.

White, M.G., Piccirillo, S., Dusevich, V., Law, D.J., Kapros, T., Honigberg, S.M. 2011. Flo11p adhesin required for meiotic differentiation in Saccharomyces cerevisiae minicolonies grown on plastic surfaces. *FEMS Yeast Res*. 11:223-32.

Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 295:1487.

Whittaker, D.K., Drucker, D.B. 1970. Scanning electron microscopy of intact colonies of microorganisms. *J Bacteriol*. 104:902-9.

Wijman, J.G., de Leeuw, P.P., Moezelaar, R., Zwietering, M.H., Abee, T. 2007. Air-liquid interface biofilms of Bacillus cereus: formation, sporulation, and dispersion. *Appl Environ Microbiol*. 73:1481-8.

Wimpenny, J. 2009. Microbial metropolis. *Adv Microb Physiol*. 56:29-84.

Wright, K.J., Seed, P.C., Hultgren, S.J. 2007. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic Escherichia coli depends on type 1 pili. *Cell Microbiol*. 9:2230-41.

Yildiz, F.H., Schoolnik, G.K. 1999. Vibrio cholerae O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:4028-33.

Zara, G., Zara, S., Pinna, C., Marceddu, S., Budroni, M. 2009. FLO11 gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology*. 155:3838-46.

Zaragoza, O., Gancedo, J.M. 2000. Pseudohyphal growth is induced in Saccharomyces cerevisiae by a combination of stress and cAMP signalling. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 78:187-94.

Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., Romling, U. 2003. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun*. 71:4151-8.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Romling, U. 2001. The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol*. 39:1452-63.