

**Karakterisatie van klinische vaginale *Candida albicans*  
isolaten en het beoordelen van de antischimmelactiviteit van  
*Saccharomyces cerevisiae* stammen**

**Afstudeerwerk ter voorbereiding van het behalen  
van de titel Professionele bachelor in Chemie**

**Academiejaar 2020-2021**

**Professionele bachelor in Chemie  
Biochemie**

**Auteur: Jade Michiels  
Mentor: Ilse Palmans  
Promotor: Dr. Liesbeth Demuyser**

UC Leuven – Limburg  
Management en Technologie • Campus Gasthuisberg  
Herestraat 49 • 3000 Leuven

## Dankwoord

In eerste instantie wil ik de UCLL en in het bijzonder Mevr. Lut Gielen en Mr. Herman Faes bedanken voor het organiseren van de stages in de Professionele bachelor in Chemie. Een stage is de ideale omgeving om je theoretische kennis om te zetten in de praktijk, om fouten te maken en jezelf te verbeteren, om jezelf te ontwikkelen en te ontdekken wat je in de komende jaren wil doen. Daarom ben ik enorm dankbaar, sta ik sterker in mijn schoenen en kan ik met zekerheid zeggen dat het werklevens iets minder spannend lijkt.

Daarom wil ik ook graag mijn stageplaats aan het departement Microbiologie en Biotechnologie van Planten en Micro-organismen aan de Katholieke Universiteit Leuven en daarbij prof. Patrick Van Dijck bedanken voor het ingaan op mijn sollicitatie en het gebruik van de infrastructuur en materiaal van de laboratoria.

Daarnaast had ik graag nog enkele belangrijke personen in de verf gezet. In eerste instantie mijn stagementor Ilse Palmans. Naast de dagelijkse begeleiding in het labo, kon ik bij haar ook terecht voor vragen, het nalezen van mijn eindwerk, verwerken van resultaten en het oplossen van al mijn problemen. Hiernaast ook dr. Liesbeth Demuyser, mijn stagepromotor, voor mij een plaatsje te geven in het Scervics project en de algemene hulp bij mijn eindwerk. Ook mijn stagebegeleider Natalie Chiaverini wil ik bedanken voor het opvolgen van mijn stage en eindwerk. Als laatste nog een shout-out naar mijn mama voor het herhaaldelijk nalezen van mijn eindwerk.

# Inhoudstafel

Dankwoord .....	II
Abstract.....	V
Lijst met figuren en tabellen .....	VI
Lijst met afkortingen en symbolen.....	VIII
<b>1 Inleiding.....</b>	<b>1</b>
1.1 Schimmelinfecties veroorzaakt door <i>Candida</i> .....	1
1.1.1 Vaginale schimmelinfecties: VVC en RVVC .....	1
1.1.2 Systemische schimmelinfecties: candidemia.....	1
1.2 Hoe infecteert <i>Candida</i> de gastheer?.....	2
1.2.1 <i>Candida albicans</i> .....	2
1.2.2 <i>Candida glabrata</i> .....	4
1.3 Behandeling van vaginale schimmelinfecties .....	4
1.3.1 Azolen.....	4
1.3.2 Polyenen.....	5
1.3.3 Allylamines.....	6
1.3.4 Andere geneesmiddelen.....	6
1.3.5 Resistentie .....	6
1.3.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als probioticum.....	7
<b>2 Materialen en methoden.....</b>	<b>9</b>
2.1 Media .....	9
2.1.1 YPD (Yeast peptone dextrose) .....	9
2.1.2 YPD serum .....	9
2.1.3 LB Ampicillin (Luria-Bertani broth) .....	9
2.1.4 Stock medium.....	9
2.1.5 CHROMagar .....	10
2.1.6 VSM (vaginaal simulatief medium)(5x geconcentreerd).....	10
2.1.7 RPMI.....	10
Voor RPMI met serum: 10% serum toevoegen aan het RPMI medium.....	10
2.1.8 PBS (10x geconcentreerd)(Fosfaatgebufferde zoutoplossing).....	10
2.2 Collecteren van vaginale <i>Candida</i> -isolaten .....	11
2.2.1 Collecteren in -80°C stock vriezer .....	11
2.2.2 Identificatie van de isolaten.....	11
2.3 Karakterisatie van vaginale <i>Candida</i> -isolaten.....	14
2.3.1 Groei in VSM- en RPMI-medium.....	14
2.3.2 Filamentatie in VSM- en RPMI-medium met serum .....	15
2.3.3 Adhesie aan menselijke HeLa cellen .....	15
2.4 Karakterisatie van <i>Candida albicans</i> in aanwezigheid van <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 17	
2.4.1 Labelen van <i>Candida albicans</i> met GFP.....	17
2.4.2 Verificatie van groei.....	21
2.4.3 Verificatie van filamentatie.....	22
2.4.4 Verificatie van adhesie.....	22
<b>3 Resultaten .....</b>	<b>23</b>
3.1 Collecteren van vaginale <i>Candida</i> -isolaten .....	23
3.2 Karakterisatie van vaginale <i>Candida</i> -isolaten.....	25
3.2.1 Groei in VSM- en RPMI-medium.....	25
3.2.2 Filamentatie in VSM en RPMI met serum.....	27
3.2.3 Adhesie aan menselijke HeLa cellen .....	29
3.3 Analyse van anti- <i>Candida</i> -eigenschappen van geselecteerde <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -isolaten.....	30
3.3.1 Labelen van <i>Candida albicans</i> met GFP.....	30
3.3.2 Verificatie van groei.....	32
3.3.3 Verificatie van filamentatie.....	33
3.3.4 Verificatie van adhesie.....	34
<b>4 Discussie.....</b>	<b>35</b>

4.1	Collecteren van vaginale <i>Candida</i> -isolaten .....	35
4.2	Karakterisatie van vaginale <i>Candida</i> -isolaten.....	35
4.3	Karakterisatie van <i>Candida albicans</i> in aanwezigheid van <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 36	
<b>5</b>	<b>Conclusie .....</b>	<b>38</b>
	<b>Referentielijst.....</b>	<b>39</b>
	<b>Bijlagen .....</b>	<b>41</b>

## Abstract

VVC of vulvovaginale candidiasis is een moeilijk te bestrijden vaginale schimmelinfectie veroorzaakt door het geslacht *Candida*. Medicatie is vaak niet voldoende om VVC te bestrijden omwille van resistentie. In dit onderzoek wordt een probioticum, *Saccharomyces cerevisiae*, getest op anti-*Candida*-eigenschappen. Eerst wordt uit verschillende vaginale *Candida*-isolaten enkele stammen geselecteerd met een maximale infectiviteit. Ze worden getest op groei in de vaginale niche, vorming van filamentatie en adhesie aan menselijke HeLa cellen. De stammen CDAL44, JS20, JS1 en Ca27A scoren het best op de testen en hebben dus een hoge virulentiegraad. Hierna wordt een *Candida*-stam op dezelfde virulentiefactoren getest in aanwezigheid van verschillende giststammen. Zo kunnen er giststammen geselecteerd worden die een veelbelovend effect hebben. De stammen die het best de drie virulentiefactoren onderdrukken zijn SBERH6, 6886 en 6883. De resultaten van dit onderzoek kunnen gebruikt worden voor verder *in vivo* onderzoek. Men kan de meest virulente *Candida*-stammen gebruiken om veelbelovende giststammen te testen in een muismodel. Verder kan er ook nagegaan worden wat het effect is van het probioticum in combinatie met geneesmiddelen tegen VVC.

# Lijst met figuren en tabellen

## Lijst met figuren

Figuur 1: Virulentiefactoren <i>C. albicans</i> . (4).....	3
Figuur 2: Infectiemechanisme <i>C. albicans</i> (links) en <i>C. glabrata</i> (rechts). (8).....	4
Figuur 3: Pathway vorming ergosterol en inhibitie door azolen (rood) en allylamines (blauw). (10) .....	5
Figuur 4: <i>C. albicans</i> mucosale infectie (A), actiemechanisme geïnactiveerde gistcel of IY (B) en levende gistcel of GI (C). (16).....	7
Figuur 5: GeneRuler 1 kb DNA ladder. (20).....	13
Figuur 6: CIp10-GFP-plasmide met restrictieplaatsen <i>Nhe</i> I en <i>Aat</i> II (rood).....	18
Figuur 7: Identificatie reeks 1 gelelektroforese.....	23
Figuur 8: Identificatie reeks 2 gelelektroforese.....	24
Figuur 9: Identificatie reeks 3 gelelektroforese.....	25
Figuur 10: Groeicurve handmatige methode reeks 1 in VSM (links) en RPMI (rechts). .....	26
Figuur 11: Groeicurve handmatige methode reeks 2 in VSM (links) en RPMI (rechts). .....	26
Figuur 12: Groeicurve handmatige methode reeks 3 in VSM (links) en RPMI (rechts). .....	27
Figuur 13: Filamentatie reeks 1 in VSM (boven) en RPMI (onder). .....	28
Figuur 14: Filamentatie reeks 2 in VSM (boven) en RPMI (onder). .....	28
Figuur 15: Filamentatie reeks 3 in VSM (boven) en RPMI (onder). .....	29
Figuur 16: Top 10 adhesie aan menselijke HeLa cellen. ....	30
Figuur 17: Gelelektroforese GFP. ....	31
Figuur 18: Gelelektroforese kolonie PCR transformanten <i>E. coli</i> met CIp10-GFP. ....	31
Figuur 19: Gelelektroforese kolonie PCR transformanten Ca3153-CIp10-GFP. ....	31
Figuur 20: Relatieve kopie nummers Ca3153-CIp10-GFP.....	32
Figuur 21: Foto's fluorescentie Ca3153-CIp10-GFP 1, 4 en 7. ....	32
Figuur 22: Verificatie van de groei in VSM (boven) en RPMI (onder). ....	33
Figuur 23: Verificatie van filamentatie in VSM giststammen volledige inhibitorische werking. ....	34
Figuur 24: Verificatie van adhesie in VSM. ....	34
Figuur 25: Primersequenties <i>Candida</i> (boven) en CIp10-GFP (onder).....	41
Figuur 26: Resultaten groei Multiskan reeks 1. ....	45
Figuur 27: Resultaten groei Multiskan reeks 2. ....	45
Figuur 28: Resultaten groei Multiskan reeks 3. ....	45
Figuur 29: Resultaten filamentatie in aanwezigheid van <i>S. cerevisiae</i> .....	49

## Lijst met tabellen

Tabel 1: Afkorting. ....	VIII
Tabel 2: Overzicht aanvraag isolaten.....	11
Tabel 3: PCR-mengsel Q5 High-Fidelity DNA polymerase. ....	12
Tabel 4: PCR-programma Q5 High-Fidelity DNA polymerase.....	12
Tabel 5: Componenten knippen CIp10-plasmide.....	18
Tabel 6: Reactiecomponenten ligatie.....	19
Tabel 7: PCR-mengsel TaKaRa Ex Taq DNA polymerase.....	19
Tabel 8: PCR-programma TaKaRa Ex Taq DNA polymerase. ....	19
Tabel 9: Componenten lineariseren plasmide. ....	20
Tabel 10: Componenten GoTaq mix. ....	21
Tabel 11: Componenten primer mix. ....	21
Tabel 12: Primers voor qPCR met <i>C. albicans</i> .....	21

Tabel 13: Referentiestammen.....	23
Tabel 14: Identificatie reeks 1. ....	23
Tabel 15: Identificatie reeks 2. ....	23
Tabel 16: Identificatie reeks 3. ....	24
Tabel 17: Overzicht gebruikte primers. ....	41
Tabel 18: <i>S. cerevisiae</i> collectie. ....	41
Tabel 19: OD-waarden reeks 1 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in VSM.....	42
Tabel 20: OD-waarden reeks 1 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in RPMI. ....	43
Tabel 21: OD-waarden reeks 2 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in VSM.....	43
Tabel 22: OD-waarden reeks 2 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in RPMI. ....	43
Tabel 23: OD-waarden reeks 3 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in VSM.....	44
Tabel 24: OD-waarden reeks 3 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in RPMI. ....	44
Tabel 25: Resultaten adhesie reeks 1. ....	46
Tabel 26: Resultaten adhesie reeks 2. ....	46
Tabel 27: Resultaten adhesie reeks 3. ....	46
Tabel 28: Resultaten groei in aanwezigheid van <i>S. cerevisiae</i> . ....	47
Tabel 29: Resultaten adhesie in aanwezigheid van <i>S. cerevisiae</i> . ....	49

## Lijst met afkortingen en symbolen

Tabel 1: Afkortingen.

Als	Agglutinine-like sequence
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
GFP	Groen fluorescent proteïne
ITS	Interne getranscribeerde spacer
LB	Luria-Bertani broth
MIC	Minimale inhibitorische concentratie
NAC-VVC	Niet <i>albicans Candida</i> VVC
OD	Optische densiteit
NCBI	Nationaal centrum voor biotechnologische informatie
PBS	Fosfaatgebufferde zoutoplossing
PCR	Polymerase ketting reactie
PCI	Fenol chloroform isoamylalcohol
Rpm	Rondes per minuut
RVVC	Herhaalde vulvovaginale candidiasis
SAP	Aspartaat gesecreteerde proteases
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TAE	Tris azijnzuur EDTA
TE	Tris EDTA
VSM	Vaginaal simulatief medium
VVC	Vulvovaginale candidiasis
YPD	Gist extract pepton dextrose



# 1 Inleiding

Ongeveer 75% van de vrouwelijke bevolking krijgt ooit in haar leven te kampen met een vaginale schimmelinfectie. De geneesmiddelen beschikbaar om deze infectie te bestrijden zijn beperkt en niet altijd even efficiënt. Dit komt door de opkomende resistentie van schimmelcellen tegen deze geneesmiddelen. Er is een hoge nood aan nieuwe medicatie en/of middelen om de efficiëntie van de therapie te verhogen. In dit onderzoek wordt een veelbelovend hulpmiddel, bakkersgist of *S. cerevisiae* als probioticum verder onderzocht. Indien uit dit onderzoek een positief resultaat bekomen wordt, kan dit later dienen als basis voor verdere *in vivo* onderzoeken en mogelijk gebruik van deze gist in behandeling van vaginale *Candida* infecties.

## 1.1 Schimmelinfecties veroorzaakt door *Candida*

Schimmelinfecties veroorzaakt door het *Candida*-geslacht kunnen gaan van oppervlakkige infecties van de huid en slijmweefsel tot dodelijke infecties in het bloed. In dit project wordt behandeling van vaginale schimmelinfecties veroorzaakt door de meest voorkomende vorm van het *Candida* geslacht, *Candida albicans* of *C. albicans*, onderzocht. Daarnaast worden deze infecties vergeleken met een andere *Candida* soort, *Candida glabrata* of *C. glabrata*, dewelke minder voorkomt maar meer resistent is tegen huidig gebruikte therapieën.

### 1.1.1 Vaginale schimmelinfecties: VVC en RVVC

VVC of vulvovaginale candidiasis is een acute infectie in de vaginale holte die bij ongeveer 75% van de vrouwen ter wereld, minstens één keer voorkomt. *Candida* schimmels komen vaak van nature voor in de vagina, als commensaal, maar kunnen naar aanleiding van een verstoring van het evenwicht onder micro-organismen of bepaalde gastheer-gerelateerde factoren aanleiding geven tot infecties. Voorbeelden van factoren die een infectie in de hand werken zijn: orale anticonceptie, langdurig gebruik van antibiotica, ongecontroleerde diabetes mellitus, zwangerschap, enz... (1) De belangrijkste symptomen van VVC zijn jeuk, roodheid, witte afscheiding en een branderig gevoel bij het plassen of vrijen. (2) Deze vorm van infectie is oppervlakkig en makkelijk te bestrijden met over-the-counter medicatie of een crème op voorschrift. Ook een éénmalige orale toediening van fluconazol zou de infectie moeten tegengaan. (3)

RVVC of herhaalde vulvovaginale candidiasis is de extremere chronische vorm van VVC en komt minder frequent voor, met name bij ongeveer 5% van de vrouwelijke bevolking. RVVC treedt op indien de patiënt vier of meer episodes van VVC ondergaat in een jaar. De symptomen kunnen wel verholpen worden, maar de vrouw zal niet genezen. De factoren die ervoor zorgen dat een vrouw overgaat van VVC naar RVVC zijn nog niet bekend. (2)

### 1.1.2 Systemische schimmelinfecties: candidemia

Bij deze vorm van infecties, zal de pathogene *Candida*-schimmel zich in het bloed begeven en een infectie veroorzaken in heel het lichaam via de bloedbanen. Candidemia is veel ernstiger en leidt bij meer dan 50% van de gevallen tot overlijden. Zelfs met de beste therapie is de patiënt vaak niet te redden. (4)

Deze infectie komt veel minder frequent voor omdat dit enkel voorvalt als de patiënt zeer ernstig verzwakt is. Er zijn wel een aantal risicofactoren. De schimmelcellen kunnen bijvoorbeeld via een katheder in het ziekenhuis het bloed betreden. Ook mensen met

neutropenie<sup>1</sup> of een beschadigde gastro-intestinale mucosa zijn risicopatiënten. Daarnaast hebben patiënten een hoger risico op besmetting bij eerder vermelde factoren zoals orale anticonceptie, gebruik van antibiotica, en kankerpatiënten in behandeling met chemotherapie. (5)

## 1.2 Hoe infecteert *Candida* de gastheer?

### 1.2.1 *Candida albicans*

*C. albicans* is een polymorfe schimmel. Het kan in verschillende vormen voorkomen, enerzijds in de vorm van gistcellen, anderzijds als schimmeldraden of hyfen. Een derde vorm, pseudohyfen, bestaat ook. Al is het hiervan nog niet duidelijk wat de rol is in een infectie.

De Y-vorm heeft de vorm van een normale ovale gistcel. Ze komt voor in de vaginale holte en de darm bij meer dan 50% van de vrouwen. De H-vorm daarentegen vormt hyfen en komt niet zo frequent voor.

*C. albicans* heeft verschillende virulentiefactoren. Dit zijn factoren die ervoor zorgen dat de schimmel pathogeen wordt en dus een infectie veroorzaakt. Beide vormen hebben een belangrijke functie in het infecteren van de gastheer. Het is dan ook belangrijk dat *C. albicans* zowel als gistvorm als hyfenvorm kan bestaan. (6)

De groei van de schimmelcellen is één van de belangrijkste factoren. Meer bepaald, de groei van de schimmelcellen in de vaginale niche in aanwezigheid van de lokale nutriënten en metabolieten en op lichaamstemperatuur. Indien in deze toestand de *Candida*-cel zich makkelijk prolifereert, heeft het al een stapje voor op de cellen die dit niet doen.

Een tweede virulentiefactor is het polymorfisme. Indien de cel overgaat van de Y-vorm naar de H-vorm, een dimorfe overgang genoemd, zal deze hyfen vormen. Dit wordt getriggerd door verschillende omgevingsfactoren. De *C. albicans*-schimmelcel bevindt zich in de Y-vorm indien de pH lager is dan 6. Als deze pH in de omgeving stijgt ondergaat de cel een dimorfe overgang. Dit gebeurt bij de aanwezigheid van serum of N-acetylglycosamine, fysiologische temperatuur of CO<sub>2</sub>. Ook d.m.v. quorum sensing, een manier van communicatie tussen de cellen, zal er een dimorfe overgang plaatsvinden. Bij een lage celdensiteit wordt de vorming van hyfen gestimuleerd. (4) In het lichaam zijn er ook verschillende mechanismen aanwezig die de dimorfe overgang hinderen. Zo zijn er *Lactobacilli* aanwezig die de pH van de omgeving d.m.v. lactaatproductie laag houden en de overgang inhiberen. (2)

D.m.v. deze hyfen kunnen de schimmelcellen binnendringen in de gastheer cel en een infectie veroorzaken, actieve penetratie genoemd. De exacte manier waarop de schimmel dat doet is nog niet bekend, men weet wel dat adhesie en fysieke krachten belangrijk zijn. Ook de Secreted aspartic proteases (SAP's) blijken belangrijk te zijn in dit proces. (4)

De hyfenvorming of filamentatie blijkt een belangrijke factor te zijn in het opsporen van vaginale *Candida* infecties. Een gynaecoloog zal een schimmelinfectie vaak diagnosticeren door het opsporen van hyfen onder de microscoop.

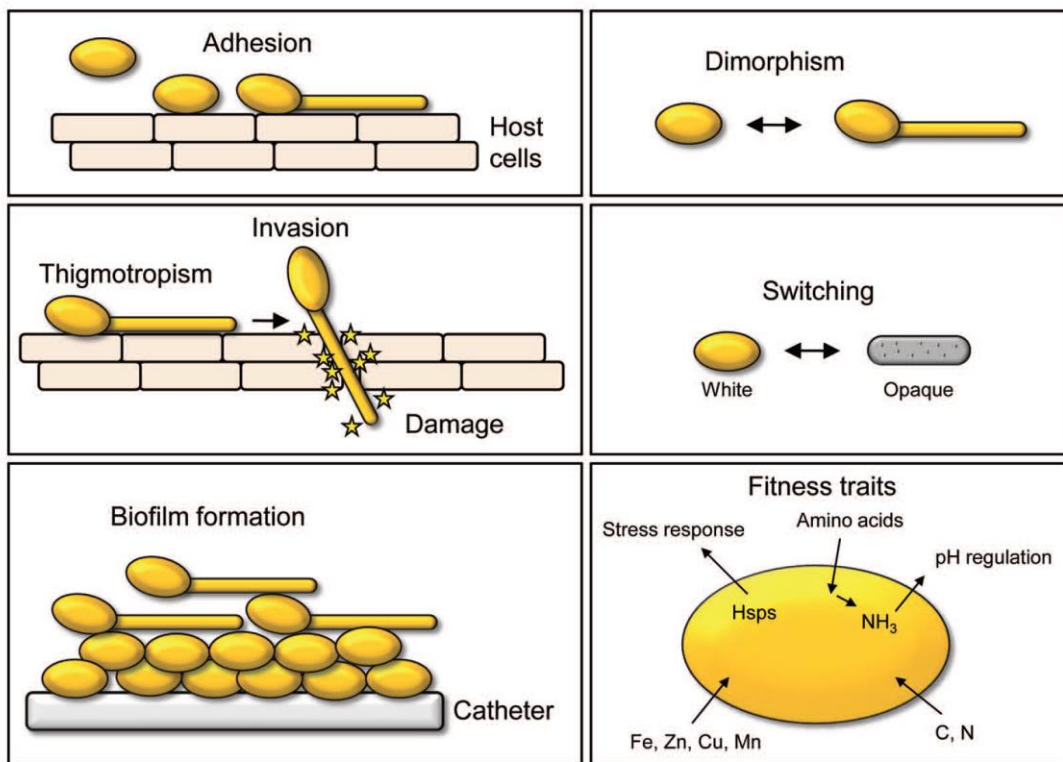
---

<sup>1</sup> Een tekort aan neutrofiële granulocyten. Dit zijn witte bloedcellen die een belangrijke rol spelen tegen voornamelijk fungale en bacteriële infecties.

Een derde virulentiefactor is de expressie van adhesines en invasines van de hyfen. Dit zijn eiwitten die de adhesie van de schimmelcellen induceren aan andere schimmelcellen, andere organismen, biotische en abiotische oppervlakken en gastheercellen. Adhesie is noodzakelijk om de gastheer initieel te koloniseren. De meest gekende adhesines zijn de agglutinine-like sequence (Als) proteïnen. In eerdere studies werd bewezen dat Als3 in hogere concentraties aanwezig is bij een schimmelinfectie met *C. albicans*. Ook het Hwp1, hyphal wall-associated GPI-linked proteïne, is een belangrijk adhesine van de *C. albicans* schimmelcel. De adhesines herkennen een ligand van de gastheer en zullen zo de binding aangaan. (1) De schimmelcellen kunnen ook invasines tot expressie brengen. Deze invasines zijn gespecialiseerde proteïnen aan het oppervlak van de cel die zorgen voor een connectie met het oppervlak van de gastheercel. Via deze weg kan *C. albicans* op een andere manier een infectie veroorzaken. Dit wordt de geïnduceerde endocytose genoemd. Door de binding van de schimmelcellen aan de gastheercellen zal er endocytose geïnduceerd worden en zal de gastheercel geïnfecteerd worden. (4) Via hydrofobe interacties zullen de schimmelcellen zich kunnen vasthechten aan abiotische oppervlakken. (1)

Ook het vormen van biofilms op abiotische en biotische oppervlakken is een virulentiefactor. De schimmelcellen in een biofilm zijn veel resistenter tegen antimicrobiële stoffen en het immuunsysteem van de gastheer. Dit komt door de complexe architecturale opbouw van zo'n biofilm. De cellen in een biofilm gaan bijvoorbeeld meer efflux pompen hebben waardoor de voor hun toxische stoffen kunnen worden weggepompt en zijn ingebed in een matrix die penetratie van de geneesmiddelen tegengaat.

Als laatste zijn er nog een aantal virulentiefactoren zoals het produceren van hydrolases om actief de gastheercel te penetreren en thigmotropisme of het makkelijk aanpassen aan zijn omgeving. De verschillende virulentiefactoren zijn weergegeven in figuur 1.



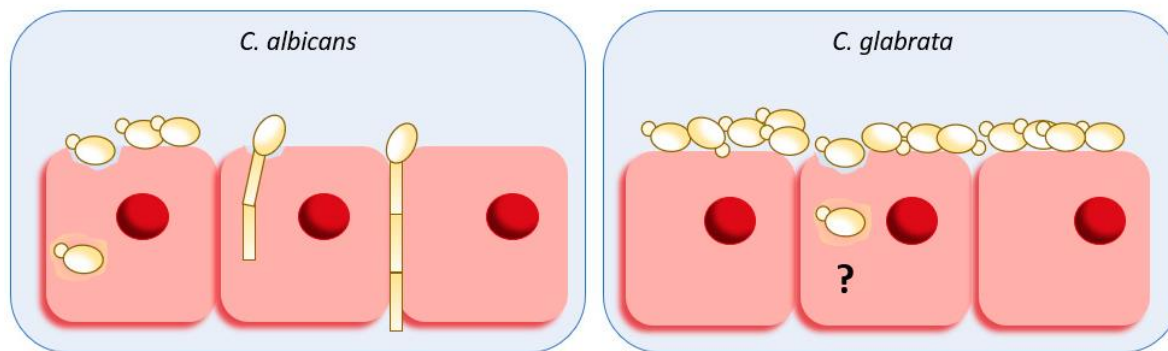
Figuur 1: Virulentiefactoren *C. albicans*. (4)

In dit onderzoek wordt er voornamelijk geconcentreerd op de drie belangrijkste virulentiefactoren. De groei, filamentatie en adhesie zullen getest worden voor de verschillende *Candida*-stammen bij af- en aanwezigheid van *S. cerevisiae*.

### 1.2.2 *Candida glabrata*

Naast *C. albicans* is *C. glabrata* de meest voorkomende oorzaak van vaginale schimmelinfecties bij vrouwen. *C. glabrata* is kleiner dan *C. albicans*. Over het algemeen is er ook geweten dat deze soort zich veel resistenter opzet dan *C. albicans*. Hierdoor zal het soort geneesmiddel of de dosis ervan moeten aangepast worden. Omdat het minder makkelijk te bestrijden is, heeft deze soort ook een hoger sterftecijfer in geval van systemische infecties. (7)

Het grootste verschil tussen *C. albicans* en *C. glabrata* is de vorm. *C. glabrata* is namelijk niet in staat om een dimorfe overgang te ondergaan. Deze heeft altijd de vorm van een ovale gistcel. Daar *C. albicans* hyfen nodig heeft om de gastheercel te infecteren, zal *C. glabrata* dat niet nodig hebben. Hoe hij de gastheer infecteert is nog niet bekend. Men zegt dat dit wel te maken heeft met geïnduceerde endocytose. In figuur 2 is het verschil weergegeven tussen *C. albicans* en *C. glabrata*. (8)



Figuur 2: Infectiemechanisme *C. albicans* (links) en *C. glabrata* (rechts). (8)

*C. glabrata* heeft net zoals *C. albicans* de eigenschappen om zich te binden aan een oppervlak of gastheercellen en een biofilm te vormen. Het verschil tussen de twee verschillende soorten *Candida*-schimmels is de opbouw en grootte van hun biofilm. De biofilm van een *C. albicans*-infectie is groot en heeft een zeer complexe structuur met ovale cellen, pseudohyfen en hyfen terwijl deze van *C. glabrata* veel kleiner is en enkel bestaat uit ovale cellen. Deze laatste heeft dus een veel compactere structuur. (1)(8)

## 1.3 Behandeling van vaginale schimmelinfecties

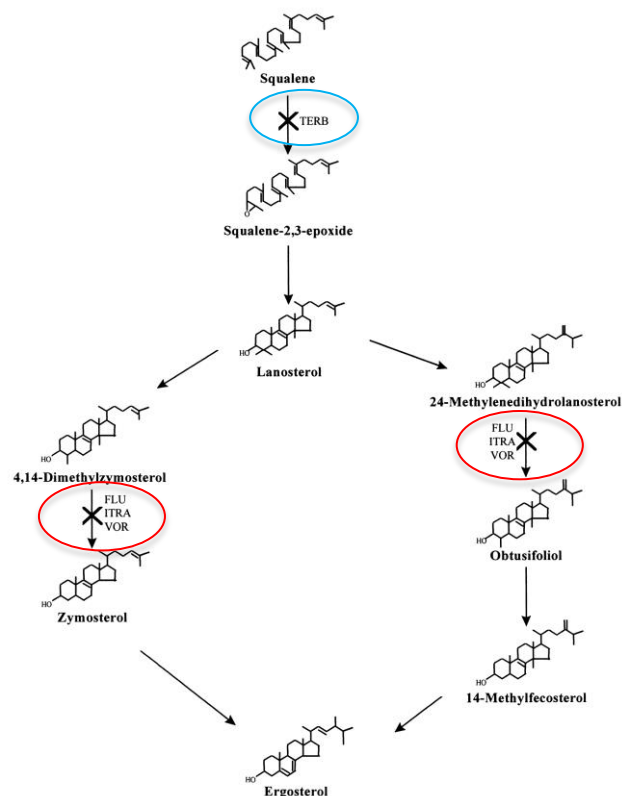
Over het algemeen is er een gering arsenaal aan antifungale stoffen beschikbaar. Schimmels in tegenstelling tot bacteriën, zijn eukaryoten zoals de mens. Er is vaak sprake van neveneffecten bij nieuwe middelen die ontwikkeld worden. De stoffen die dan al op de markt zijn, hebben vaak een lage efficiëntie in het bestrijden van de schimmelinfectie.

### 1.3.1 Azolen

Azolen zijn de belangrijkste groep van geneesmiddelen gebruikt tegen schimmelinfecties veroorzaakt door *C. albicans*. Voorbeelden van azolen zijn fluconazol en itraconazol. Azolen

zijn makkelijk te produceren en kunnen oraal ingenomen worden als pilvorm en lokaal aangebracht als crème.

Azolen werken in op de vorming van ergosterol. Het is een belangrijke component van de fungale membraan. Het is een bioregulator van de vloeibaarheid en integriteit van het membraan. In Figuur 3 is de pathway van de vorming van ergosterol weergegeven. Azolen gaan specifiek het cytochroom P450 enzyme 14- $\alpha$ -demythelase inhiberen dat de vorming van enerzijds 4,14—dimethylzymosterol naar zymosterol en anderzijds 24-methyleendihydrolanosterol naar obtusifoliol medieert. Zymosterol en obtusifoliol zijn precursoren van ergosterol. Bij afwezigheid van ergosterol zal de integriteit van het membraan veranderen waardoor poriën ontstaan en de groei van de schimmel geïnhibeerd wordt. Het membraan krijgt een andere structuur en functie. (9)(10)(11)



Figuur 3: Pathway vorming ergosterol en inhibitie door azolen (rood) en allylamines (blauw). (10)

NAC-VVC of non-*albicans* *Candida* VVC is VVC veroorzaakt door ander dan *Candida* schimmels dan *C. albicans*, bijvoorbeeld *C. glabrata*. Omdat de niet-*albicans*-stammen vaak resistent zijn tegen azolen is er nood aan andere geneesmiddelen om deze NAC-VVC te onderdrukken. (3)

### 1.3.2 Polyenen

Polyenen zijn de langst gekende antifungale middelen tegen *Candida*-infecties en waren heel belangrijk tot de ontdekking van azolen. Het belangrijkste voorbeeld is amphotericine B. (10)

Polyenen werken net zoals azolen in op het membraan van de schimmelcellen. Ze interageren met de membraansterolen en zorgen voor de vorming van waterige poriën waardoor de permeabiliteit van het membraan verandert. Het gevolg is lekkage van monovalente ionen en belangrijke cytoplasma-componenten. Nadien gaat de cel dood.

(9)(10) Polyenen hebben een tweede mechanisme om de schimmelcellen te verdrijven. Via opeenvolgende oxidatiereacties en interacties met lipoproteïnen kunnen de polyenen de permeabiliteit van het membraan verminderen, wat leidt tot de dood van de schimmelcellen. (9)

### 1.3.3 Allylamines

Allylamines, zoals terbinafine en naftifine, worden geclassificeerd als nieuwe ergosterol inhibitors. Ze inhiberen ook de synthese van ergosterol, vroeger in de pathway dan de azolen. Dit is in figuur 3 weergegeven in het blauw. De vorming van squaleen-2,3-epoxide wordt stopgezet door inhibitie van het squaleen epoxidase waardoor er een opstapeling is van squaleen. Hoge concentraties van squaleen leiden tot hogere permeabiliteit van het membraan dat op zijn beurt leidt tot het afbreken ervan. (9)(10)

### 1.3.4 Andere geneesmiddelen

Naast azolen, polyenen en allylamines zijn er nog enkele groepen van geneesmiddelen, deze komen minder frequent voor. Echinocandines, Caspofungine is hier het belangrijkste voorbeeld van, is zo een groep van medicatie. Het inhibeert het enzyme  $\beta$ -1-3-glucan synthase nodig voor de vorming van glycan, een belangrijke component in de celwand van de schimmelcel. Dit geneesmiddel is, naast amphotericine B, het enige dat efficiënt werkt in aanwezigheid van een biofilm. Omdat het een relatief grote molecule is, moet dit intraveneus worden toegediend. Verder wordt het vaak niet meteen gebruikt omwille van de hoge kostprijs. (12)

### 1.3.5 Resistentie

De resistentie van een organisme voor een bepaald geneesmiddel wordt uitgedrukt in de MIC of minimale inhibitorische concentratie. Dit is de laagste concentratie waarbij de groei van een organisme nog net wordt geremd. Vaak wordt dit uitgedrukt in MIC<sub>50</sub> en MIC<sub>90</sub> waarbij respectievelijk 50% en 90% van het organisme geïnhibeerd wordt. (13)

Er zijn heel wat manieren voor een schimmelcel om resistentie tegen medicatie te creëren. Dit is dan ook het grootste probleem bij *Candida*-schimmelinfecties en de behandeling ervan. De nood aan nieuwe therapieën is hoog. Verschillende onderzoeken worden gedaan naar nieuwe medicatie, het omzeilen van de resistentie of het gebruik van probiotica.

Zo is er een onderzoek bezig naar een immunologische behandeling in de vorm van een vaccin. Dit vaccin zou de immuunrespons induceren zodat de infectie tegen gegaan wordt. De schimmelcellen produceren SAP's en in aanwezigheid van deze factoren kan de ronde schimmelcel overgaan naar hyfen. Een mogelijkheid is een vaccin met anti-SAP antilichamen zodat deze hyfen niet meer gevormd worden en de schimmel minder pathogeen wordt. (2)

Verder wordt er ook onderzoek gedaan naar het effect van melkzuur en azijnzuur in aanwezigheid van azolen. Hierbij valt op dat indien de pH daalt d.m.v. deze zuren de MIC-waarden ook dalen. Dit wil zeggen dat er een lagere concentratie medicatie nodig is om hetzelfde aantal schimmelcellen te inhiberen. Hier kan gesproken worden van een synergetische werking tussen het melkzuur of azijnzuur en de azolen. (14)

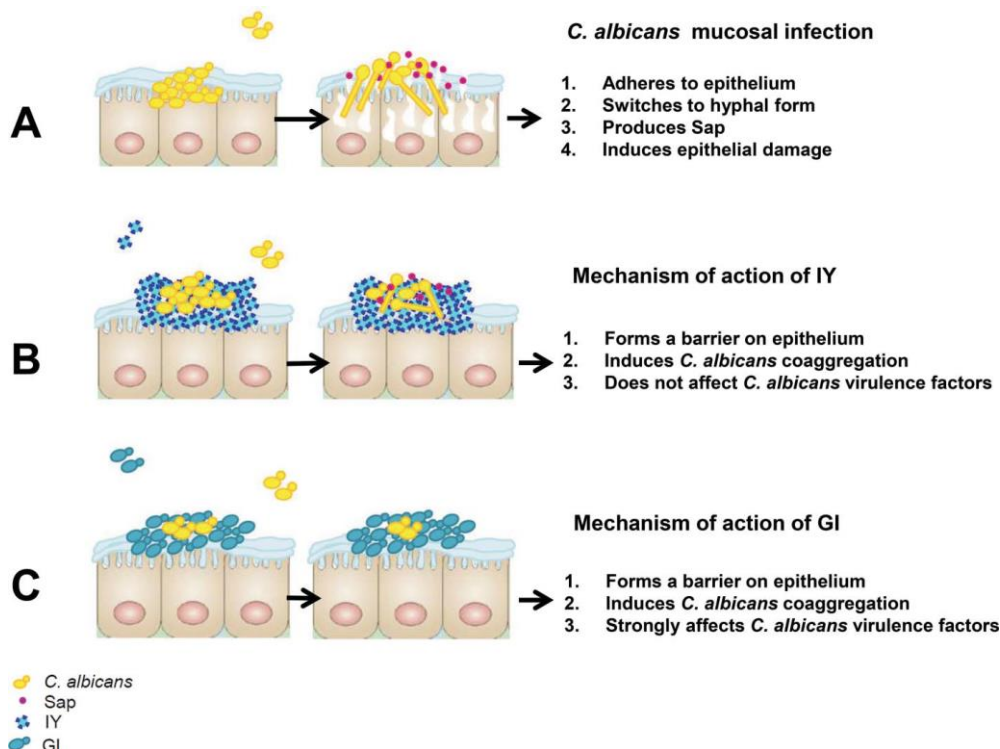
### 1.3.6 *Saccharomyces cerevisiae* als probioticum

Een probioticum is een levend organisme dat de gastheer een voordelige gezondheidssituatie oplevert. Een probioticum kan er bijvoorbeeld voor zorgen dat er bepaalde virulentie factoren van een pathogeen micro-organisme onderdrukt zijn zodat een infectie uitblijft.

Er is al bewezen dat een probioticum een goede oplossing kan zijn om een ziekte te voorkomen of te genezen. Zo wordt er bijvoorbeeld bij kinderen die lijden aan een ontsteking veroorzaakt door het Rotavirus, een probioticum o.b.v. *Lactobacillus rhamnosus GG* toegediend. Dit leidt tot een sterke vermindering van de duurtijd van de ziekte. (15)

In eerder onderzoek werd al aangetoond dat *S. cerevisiae* kan dienen als probioticum in de bestrijding van VVC. (16) In dat onderzoek werd er echter een verschil gemaakt tussen een geïnactiveerde gistcel (IY) en een levende gistcel (GI). Beide zorgen voor een reductie van de adhesie van de schimmelcellen aan de epitheelcellen van de vaginale binnenwand. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de gistcellen in competitie gaan met de schimmelcellen. Ze vormen namelijk een barrière op de epitheelcellen door hieraan te hechten. Hierdoor zal de adhesie van de schimmelcellen dus verminderen.

Een andere belangrijke virulentiefactor van *C. albicans*-schimmelcellen is filamentatie. De schimmelcellen produceren SAP's. De levende gistcellen zullen deze SAP's onderdrukken waardoor er geen hyfen worden gevormd en de schimmelcellen in hun gistcelvorm blijven. Bij de geïnactiveerde vorm van de gistcellen gebeurt dit niet. Hieruit blijkt dat indien een *S. cerevisiae*-probioticum wordt toegevoegd, dat best levend is. (16) Het verschil tussen een geïnactiveerde gistcel (IY) en een levende gistcel (GI) is weergegeven in figuur 4.



Figuur 4: *C. albicans* mucosale infectie (A), actiemechanisme geïnactiveerde gistcel of IY (B) en levende gistcel of GI (C). (16)

Het doel van dit project is het gebruik van *S. cerevisiae*, als probioticum tegen schimmelinfecties, te onderzoeken. Het onderzoeksproject bestaat uit twee grote delen,

enerzijds het collecteren en karakteriseren van klinische *C. albicans*-schimmelcellen als testmateriaal, anderzijds het effect nagaan van verschillende *S. cerevisiae*-stammen op de groei en virulentie van deze *C. albicans*-cellen.

In eerste instantie wordt de exacte identiteit van de *Candida*-isolaten nagekeken door middel van ITS (internal transcribed spacer) sequencing. Hiertoe wordt uit de stammen eerst het DNA geïsoleerd, geamplificeerd via PCR (polymerase ketting reactie) en zichtbaar gemaakt met gelelektroforese. Het DNA wordt opgestuurd voor ITS sequencing.

Nadat de identiteit van de stammen gekend is, worden drie belangrijke eigenschappen getest van de schimmelcellen, die gerelateerd zijn aan hun pathogeniciteit en infectiviteit. Ten eerste wordt de groei nagegaan in VSM (vaginaal simulatief medium, een medium dat de vaginale omgeving nabootst) en RPMI medium (genoemd naar Roswell Park Memorial Institute medium, waar het werd uitgevonden, een medium dat bloed nabootst). (17) De optische dichtheid wordt gemeten na 4,6,8,24 en 48 uur. Hoe beter de cellen groeien in VSM, hoe meer waarschijnlijk dat ze een hogere infectiviteit hebben in de vaginale niche. Het RPMI medium wordt getest als controle. Ten tweede wordt de hoeveelheid filamentatie beoordeeld. Filamenten zijn lange schimmeldraden, waarmee de schimmel het weefsel binnendringt. Hoe meer filamentatie, hoe hoger de infectiviteit. Als laatste wordt ook de adhesie van de cellen nagegaan aan humane cellen. Ook hier geldt, hoe sterker de adhesie, hoe hoger de infectiviteit.

Aan het einde van dit eerste deel, zullen we een aantal *Candida*-isolaten selecteren die maximale infectiviteit vertonen in onze *in vitro* testen. Deze stammen zullen verder gebruikt worden voor onderzoek naar probiotica die vaginale infecties kunnen tegengaan.

In het tweede deel van het onderzoek worden bovenstaande karakteristieken opnieuw getest, maar dan in aanwezigheid van *S. cerevisiae*-gistcellen. Op die manier kan het effect van de gistcellen op de schimmelcellen worden nagegaan en vergeleken met de schimmelcellen zonder toevoeging van *S. cerevisiae*. Als de gistcellen de groei, filamentatie of adhesie van de schimmelcellen kunnen verminderen, is dat een indicatie dat deze *S. cerevisiae*-stam een goed probioticum kan zijn. Om het verschil tussen de schimmelcellen en de gistcellen te kunnen zien, worden de schimmelcellen gelabeld met een groen fluorescent proteïne, GFP.



## 2 Materialen en methoden

### 2.1 Media

#### 2.1.1 YPD (Yeast peptone dextrose)

Voor 1 liter medium:

- 1) 10 g Yeast Extract granulated
- 2) 20 g Bacteriological peptone
- 3) (20 g agar voor voedingsbodems)
- 4) 950 ml demiwater
- 5) Autoclaveren gedurende minstens 20 min bij 120°C
- 6) 50 ml 40% glucose (finaal 2%)

Voor YPD Nourseothricine 200 mg/l:

- 1) YPD medium afkoelen tot onder 60°C
- 2) 2 ml van een 100 mg/ml Nourseothricine oplossing
- 3) Bewaren op 4°C

#### 2.1.2 YPD serum

Voor 1 liter medium:

- 1) 10 g Yeast Extract granulated
- 2) 20 g Bacteriological peptone
- 3) 850 ml demiwater
- 4) Autoclaveren gedurende minstens 20 min bij 120°C
- 5) 50 ml 40% glucose (finaal 2%)
- 6) 100 ml serum (FBS, Fetal Bovine Serum)

#### 2.1.3 LB Ampicillin (Luria-Bertani broth)

Voor 1 liter medium:

- 1) 20 g LB broth
- 2) (20 g agar voor platen)
- 3) 1 liter demiwater
- 4) Autoclaveren voor minstens 20 min bij 120°C
- 5) Medium afkoelen tot onder 60°C
- 6) 1 ml van een 100 mg/ml ampicilline oplossing

#### 2.1.4 Stock medium

Voor 100 ml medium:

- 1) 1 g Yeast Extract granulated
- 2) 2 g Bacteriological peptone
- 3) 30 ml glycerol 98%
- 4) 70 ml milliQ water
- 5) Autoclaveren voor minstens 20 min bij 120°C

### 2.1.5 CHROMagar

Voor 1 liter medium:

- 1) 47,7 g CHROMagar
- 2) 1 liter milliQ water
- 3) Autoclaveren tot maximum 110°C en laten afkoelen
- 4) Bewaren op 4°C

### 2.1.6 VSM (vaginaal simulatief medium)(5x geconcentreerd)

Voor 1 liter:

- 1) 17,55 g NaCl
- 2) 7,77 g KOH
- 3) 1,17 g Ca(OH)<sub>2</sub>
- 4) 2 g Ureum
- 5) 8,5 g YNB
- 6) 25 g ammoniumsulfaat
- 7) 900 ml milliQ water
- 8) 11,76 ml lactic acid (85% m/v)
- 9) 4,76 ml acetic acid (100% v/v)
- 10) 20 ml van een 0,25g/50ml BSA-oplossing
- 11) Roeren tot alles oplost
- 12) pH aanpassen tot 4,2 met 4M HCl
- 13) Steriliseren door filtratie, gebruik een 0,2 micron filter en een vacuümpomp
- 14) 62,5 ml 40% glucose
- 15) 0,65 ml 98% glycerol
- 16) Bewaren op 4°C

Voor VSM met serum: 10% serum toevoegen aan het VSM-medium.

### 2.1.7 RPMI

Voor 1 liter medium:

- 1) 10,4 g RPMI 1640 (bevat 0,2% glucose)
- 2) 34,53 g MOPS
- 3) 1 liter milliQ water
- 4) pH aanpassen tot 7 met 4M NaOH (medium verandert van een gele naar een roze kleur)
- 5) Steriliseren door filtratie, gebruik een 0,2 micron filter en een vacuümpomp
- 6) Bewaren op 4°C

Voor RPMI met serum: 10% serum toevoegen aan het RPMI medium.

### 2.1.8 PBS (10x geconcentreerd)(Fosfaatgebufferde zoutoplossing)

Voor 1 liter medium:

- 1) 80 g NaCl
- 2) 2 g KCl
- 3) 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

- 4) 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 5) 1 liter milliQ water
- 6) pH aanpassen tot 7,4
- 7) Autoclaveren voor minstens 20 min bij 120°C

## 2.2 Collecteren van vaginale *Candida*-isolaten

De stalen werden aangevraagd bij verscheidene academische labo's, zoals weergegeven in onderstaande tabel 2. Elke stap van het onderzoek dat hieronder vermeld wordt, werd uitgevoerd op elk van deze isolaten. De stammen werden onderverdeeld in verschillende reeksen om het overzicht te bewaren. In de sectie Resultaten, tabel 14-16, zijn de reeksen weergegeven met de exacte benamingen van de stammen met de bijhorende identificatie. In tabel 13 zijn de referentiestammen weergegeven.

Tabel 2: Overzicht aanvraag isolaten.

	<b>Bron</b>	<b>Aantal</b>	<b>Informatie?<sup>2</sup></b>	<b>Referentie</b>
<b>Reeks 1</b>	Prof. K. Lagrou (UZ Leuven)	10	Niet beschikbaar	Niet gepubliceerd
<b>Reeks 2</b>	Prof. B. Peters (University of Tennessee)	9	Beschikbaar	Gerwien et al., 2020
<b>Reeks 3</b>	Prof. T. Coenve (UGent)	15	Beschikbaar	De Vos et al.,2005

### 2.2.1 Collecteren in -80°C stock vriezer

Alle stammen werden uitgestreken op YPD platen. Na 24 tot 48 uur incubatie op 30°C bij normale atmosfeer werden cellen van de plaat geschraapt en opgelost in 1 ml stock medium en hierna ingevroren op -80°C. Hier kunnen ze voor een langere tijd bewaard worden.

### 2.2.2 Identificatie van de isolaten

Als eerste stap van de identificatie werd het DNA geïsoleerd uit de schimmelcellen d.m.v. ethanol precipitatie. Hiervoor werden de cellen op voorhand uit de stock gehaald en geënt op YPD platen. De cellen groeiden 24 uur op 30°C bij normale atmosfeer.

Materiaal: 1,5 ml Eppendurf tubes, 2 ml tubes met schroefdop, 3M NaAc pH 5,2, centrifuge, ethanol 70% (in milliQ water), ethanol 100%, fastprep machine, glasbolletjes, PCI (fenol/chloroform/isoamylalcohol – verhouding 25/24/1), TE-buffer (1x) (10 mM Tris – 1mM EDTA – pH 8)

Protocol:

- 1) Schraap de cellen van een plaat en los deze op in 400 µl 1x TE-buffer in een 2 ml tube met schroefdop

---

<sup>2</sup> Informatie over de exacte aandoening van de patiënt, bv. asymptomatisch, VVC of RWVC.

- 2) Voeg glasbolletjes toe (de hoeveelheid van 1 PCR-tube)  
De glasbolletjes zorgen ervoor dat de cellen stuk gaan en het DNA kan gescheiden worden van de rest.
- 3) Voeg 400 µl PCI toe (gebruik de onderste laag)
- 4) Zet de tube in de fastprep machine (30 sec @ speed 6)
- 5) Centrifugeer voor 10 min bij 14000 rpm op kamertemperatuur (de bovenste laag bevat het DNA)
- 6) Neem 300 µl van de bovenste laag en breng over in een nieuwe 1,5 ml Eppendorf tube
- 7) Voeg 30 µl NaAc 3M pH 5,2 toe
- 8) Voeg 900 µl 100% ethanol toe
- 9) Vortex en zet minstens 20 minuten in de vriezer (-20°C)
- 10) Centrifugeer 10 min op 14000 rpm bij 4°C
- 11) Verwijder het supernatans en was de pellet met 500 µl 70% ethanol
- 12) Centrifugeer 10 min op 14000 rpm bij 4°C
- 13) Verwijder supernatans (zoveel mogelijk)
- 14) Laat de pellet drogen (dit kan in een heat block bij 30-37°C)
- 15) Los de pellet op in 100 µl milliQ water


De concentratie van het DNA werd gemeten met het Nanodrop toestel (Thermo Scientific) en aangepast tot 200 ng/µl.

Via PCR werd de ITS1 regio van de *Candida*-cellen geamplificeerd met de universele primers ITS2 en ITS4. De ITS regio is specifiek voor één bepaalde *Candida*-stam. Deze specifieke regio wordt geamplificeerd en later geïdentificeerd en zal dus overeenkomen met één specifieke *Candida*-stam. (18) Voor PCR werd er gebruik gemaakt van Q5 High-Fidelity DNA polymerase. Voor Q5 polymerase wordt in tabel 3 de componenten van het PCR-reactiemengsel weergegeven en in tabel 4 het gebruikte PCR-programma.

Tabel 3: PCR-mengsel Q5 High-Fidelity DNA polymerase.

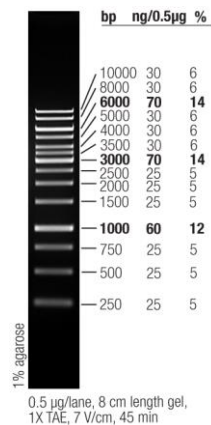
Component	Aantal µl
Template	1
Voorwaartse primer (100 µM)	0,4
Achterwaartse primer (100 µM)	0,4
10 mM dNTP's	5
5x Q5 reactie buffer	10
Q5 polymerase	0,5
Water	Tot 50

Tabel 4: PCR-programma Q5 High-Fidelity DNA polymerase.

Stap	Temperatuur	Tijd	
Initiële denaturatie	98°C	30"	 35 cycli
Denaturatie	98°C	10"	
Annealing	50-72°C	30"	
Elongatie	72°C	30" per kb	
Finale elongatie	72°C	2'	
Afkoeling	10°C	pauze	

De PCR-fragmenten werden via agarose gelelektroforese gecontroleerd. Dit is een techniek die de scheiding van DNA fragmenten toelaat op basis van de grootte. Hierbij bestaat de gel uit agarose, TAE buffer en SYBR™ Safe van ThermoFisher Scientific. De agarose, geïsoleerd

uit zeewier, vormt een netwerk van draden met poriën. De grootte van de poriën is afhankelijk van de concentratie agarose toegevoegd in de gel. SYBR™ Safe dient als merker, het bindt zich aan het DNA en kan op deze manier visueel waargenomen worden. Aan de DNA stalen wordt een ladingsbuffer toegevoegd. Deze heeft een blauwe kleur afkomstig van bromofenol blauw en xyleen cyanol. De buffer bevat ook glycerol dat ervoor zorgt dat het DNA op de bodem van de well een laag vormt. Het DNA is omwille van zijn fosfaatuiteinden negatief geladen. Indien deze onderworpen wordt aan een elektrisch veld zal het DNA zich voortbewegen naar de positieve kathode, afhankelijk van zijn grootte zal deze verder of minder ver migreren door de poriën van de agarose. Als de gel volledig doorlopen is, worden de PCR-bandjes gevisualiseerd in aanwezigheid van blauw licht. Belangrijk is dat er een ladder wordt meegenomen. Dit is een oplossing met verschillende fragmenten waarvan de exacte grootte gekend is. Hiermee kan men vergelijken of de DNA fragmenten de gewenste grootte hebben. Een voorbeeld van een ladder is gegeven in figuur 5. (19)



Figuur 5: GeneRuler 1 kb DNA ladder. (20)

Materiaal: Agarose, erlenmeyer, SYBR™ Safe, Ladingsbuffer, microgolfoven, TAE-buffer

Protocol voor 50 ml:

- 1) Voeg 0,5 g agarose (1%) toe aan 50 ml TAE-buffer in een erlenmeyer
- 2) Warm op tot de agarose is opgelost
- 3) Voeg 2,5 µl SYBR™ Safe (0,5%) toe
- 4) Giet de oplossing uit en laat opstijven
- 5) Voeg 2 µl ladingsbuffer toe aan 5 µl PCR product
- 6) Laad de PCR producten op de gel
- 7) Laat de gel 30 min lopen op 100 V in het elektroforesetoestel
- 8) Visualiseer de gel en controleer juistheid van de PCR stalen

Als laatste stap in de identificatie van de isolaten werd het PCR fragment opgestuurd voor ITS sequencing. Dit werd gedaan via TubeSeq bij Eurofins-genomics. ITS sequencing is niet de meest exacte methode. Maar omdat in dit experiment enkel de stam moet geïdentificeerd worden en niet de exacte sequentie gekend moet zijn, is dit voldoende.

Later werd de stam geïdentificeerd door de verkregen sequentie te vergelijken met een DNA-databank. Hier werd gebruik gemaakt van de databank van het nationaal centrum voor biotechnologische informatie of het NCBI. Een deel van de DNA-code kan ingegeven worden en dan wordt deze vergeleken met de databank van de website. De website geeft dan een overeenkomstig organisme, in dit experiment *C. albicans* of *C. glabrata*.

## 2.3 Karakterisatie van vaginale *Candida*-isolaten

### 2.3.1 Groei in VSM- en RPMI-medium

Voor de groei van de cellen werd de OD-waarde (optische densiteit) of absorptie gemeten van de cultuur na verschillende tijdstippen. De optische densiteit is een maat voor de troebelheid van een vloeistof. Indien de vloeistof meer troebel is, en er dus meer cellen aanwezig zijn, zal het licht meer verstrooid worden en een hogere absorptie of optische densiteit aangeven. Hoe hoger deze waarde, hoe meer de cellen gegroeid zijn.

In dit onderzoek werden twee methoden gebruikt om de groei van de schimmelcellen te meten. Enerzijds een handmatige methode waarbij de OD-waarde van de culturen in proefbuisjes na 4,6,8,24 en 48 uur gemeten wordt met het spectrofotometer toestel (Eppendorf). Anderzijds is er een automatische methode waarbij de absorptie iedere 30 minuten gedurende 48 uur gemeten wordt, namelijk met behulp van de Multiskan (Thermo scientific Multiskan FC).

Materiaal: 1,5 ml Eppendorf tubes, 5 ml proefbuizen, 96-well plaat, centrifuge, Multiskan, PBS, RPMI, schudincubator 30°C en 37°C, spectrofotometer, VSM

Voor beide methoden zijn de eerste stappen van het protocol gelijk:

- 1) Kolonies worden vanaf een YPD plaat geënt in proefbuisjes met 5 ml VSM en overnacht schuddend geïncubeerd op 30°C bij normale atmosfeer
- 2) Breng 1 ml van deze precultuur over in een steriele eppendorf tube
- 3) Centrifugeer 1 min bij 7500 rpm op kamertemperatuur
- 4) Verwijder het supernatans
- 5) Was de cellen 2 keer met PBS (1x) (goed vortexen)
- 6) Los de cellen op in 1 ml PBS (1x)
- 7) Meet de OD-waarde

Vervolg protocol handmatige methode:

- 8) De culturen worden verdund tot OD 0,1 in proefbuisjes met 5 ml voorverwarmd VSM- of RPMI-medium
- 9) Plaats de proefbuisjes in een schudincubator op de juiste temperatuur bij normale atmosfeer  
Het schudden zorgt ervoor dat er zuurstof aan de cellen komt om te kunnen groeien.  
voor VSM-medium: 37°C  
voor RPMI-medium: 30°C
- 10) Meet de OD-waarde met de spectrofotometer na 4-6-8-10-24-48 uur
- 11) Analyseer het resultaat

Vervolg protocol Multiskan:

- 8) Maak een verdunning van OD 0,01 in voorverwarmd VSM- of RPMI-medium  
Dit kan best in 2 stappen. Maak eerst een verdunning naar OD 1, vervolgens wordt hieruit een verdunning naar OD 0,01 gemaakt.
- 9) Voeg 200 µl van de verdunning toe in een steriele 96-well plaat met platte bodem en plak de plaat af met een sticker  
Elke stam wordt in drievoud gemeten. Er wordt ook telkens een blanco (enkel medium) meegenomen.
- 10) Zet de 96-well plaat in de Multiskan voor 48 uur

voor VSM-medium: 37°C  
voor RPMI-medium: 30°C

### 11) Analyseer het resultaat

#### 2.3.2 Filamentatie in VSM- en RPMI-medium met serum

Voor het nagaan van de filamentatie werden de culturen grondig bestudeerd onder een microscoop op verschillende tijdstippen. Hierbij kon er gekeken worden welke vorm de cellen hebben en of er al dan niet filamentatie gevormd werd.

Materiaal: 1,5 ml Eppendorf tubes, 5 ml proefbuizen, centrifuge, microscoop, PBS, RPMI, schudincubator 30°C en 37°C, serum, spectrofotometer, VSM

Protocol:

- 1) Kolonies worden vanaf een YPD plaat geënt in proefbuisjes met 5 ml VSM en overnacht schuddend geïncubeerd op 30°C bij normale atmosfeer
- 2) Breng 1 ml precultuur over in een steriele Eppendorf tube
- 3) Centrifugeer 1 min bij 7500 rpm op kamertemperatuur
- 4) Verwijder het supernatant
- 5) Was de cellen 2 keer met PBS (1x) (goed vortexen)
- 6) Los de cellen op in 1 ml milliQ water of PBS (1x)
- 7) Meet de OD-waarde
- 8) De culturen worden aangepast tot OD 0,1 in 5 ml voorverwarmd VSM+serum of RPMI+serum
- 9) Plaats de proefbuisjes in een schudincubator bij 37°C bij normale atmosfeer
- 10) Bekijk de filamentatie na 4-6-8-24-48 uur onder de biologische microscoop

#### 2.3.3 Adhesie aan menselijke HeLa cellen

De adhesie van de schimmelcellen aan menselijke HeLa cellen werd nagegaan. De HeLa cellen werden bewaard in een stock met vloeibare stikstof. De cellen werden eerst ontdooit en geïncubeerd. Als de cellen voldoende gegroeid waren, konden deze nadien gesplitst worden.

Materiaal: 50 ml tube, ethanol, centrifuge, CO<sub>2</sub> incubator 37°C, cultuurfles, DMEM-medium: DMEM + 1x GlutaMax + 10% FCS + 50 µg/l gentamicine, PBS, pipet, trypsine (10x), waterbad

Protocol ontdooien HeLa cellen:

- 1) Neem 1 tube met cellen uit de stock met vloeibare stikstof
- 2) Ontdooi de cellen maximum 2 minuten in een waterbad van 37°C  
Let erop dat de dop niet te diep in het water zit. De dop mag niet nat worden.
- 3) Maak de tube grondig schoon met ethanol
- 4) Doe de inhoud in 9 ml groeimedium (DMEM), pipeteer op en neer om te mengen
- 5) Centrifugeer 10 min bij 100 g op kamertemperatuur
- 6) Verwijder het supernatans d.m.v. een pipet
- 7) Voeg 2 ml vers DMEM toe en meng d.m.v. een pipet
- 8) Voeg 2 ml van de celcultuur toe in een nieuwe cultuurfles en voeg DMEM toe tot 20 ml
- 9) Incubeer de cellen ten minste 3 dagen voor te splitsen (de groei kan trager zijn indien de cellen afkomstig zijn van de stock)

Protocol splitsen HeLa cellen (75 cm<sup>2</sup> cultuurfles):

- 1) Was de HeLa cellen 2 maal met PBS (10 ml)
- 2) Voeg 200 µl 10x trypsine toe in 2 ml PBS
- 3) Incubeer voor 5 min bij 37°C bij 5% CO<sub>2</sub>
- 4) Controleer of de cellen los zijn van de bodem onder een microscoop
- 5) Voeg 15 ml DMEM medium toe met Glutamax, FCS en gentamicine
- 6) Meet de concentratie van de cellen
  - Voeg 20 µl cellen toe bij 80 µl trypan blue (0,4%)
  - Tel 5 grote vierkanten onder de microscoop (10x)
  - Bereken de hoeveelheid cellen met onderstaande formule

$$\text{Aantal cellen} \times \frac{5}{5} \times 10000 \frac{\text{cellen}}{\text{ml}}$$

- 7) Zaai de cellen tussen 100 000 en 200 000 cellen/ml in DMEM met Glutamax, FCS en antibiotica
- 8) Incubeer bij 37°C bij 5% CO<sub>2</sub>

De cellen kunnen 2 tot 3 keer per week gesplitst worden.

Indien de HeLa cellen voldoende gegroeid zijn, kan de adhesie van de schimmelcellen bepaald worden.

Materiaal: 3 ml proefbuizen, 96-well plaat, CO<sub>2</sub> incubator 37°C, cuvetten, DMEM-medium: DMEM + 1x GlutaMax + 10% FCS + 50 µg/l gentamicine, microscoop, glasparels, PBS, schudincubator 30°C, spectrofotometer, trypsine, YPD platen, YPD

Protocol:

- 1) Splits de HeLa cellen en zaai ze in een adhesie 96-well plaat bij 10 000 cellen/well aan 100 µl per well. Dit komt overeen met 10<sup>5</sup> cellen/ml in DMEM-medium. Incubeer bij 37°C bij 5% CO<sub>2</sub> voor 48 uur. Het is belangrijk om 100% confluentie te hebben zodat de *Candida*-cellen niet aan de rand van de plaat adheren.
- 2) Kolonies van *Candida*-cellen worden vanaf een YPD plaat geënt in proefbuisjes met 5 ml VSM en overnacht schuddend geïncubeerd op 30°C bij normale atmosfeer
- 3) Breng 1 ml precultuur over in een steriele Eppendorf tube
- 4) Centrifugeer 1 min bij 7500 rpm op kamertemperatuur
- 5) Verwijder het supernatans
- 6) Was de *Candida*-cellen 3 keer met PBS
- 7) Voeg OD 0,1 toe aan de HeLa cellen  
Dit mag maximaal 10 µl in 100 µl zijn. Er wordt een 10x geconcentreerde oplossing gemaakt in PBS. Dit is een celoplossing van OD 1.
- 8) De cellen worden toegevoegd aan de rand van de well zonder de bodem te raken  
Pipeteer voorzichtig 10 keer op en neer
- 9) Incubeer de plaat voor 90 min bij 37°C bij 5% CO<sub>2</sub>

Omdat niet elke stam hetzelfde aantal cellen in OD 1 heeft, werd hier het relatief aantal geadherde cellen aan de HeLa cellen berekend. Hierbij werd het aantal cellen in OD 1 bepaald. De celoplossing werd hiertoe 2 maal 100x verdund en 100 µl uitgeplaat op YPD platen. Na 48 uur incubatie bij 37°C bij normale atmosfeer werden de kolonies geteld en het aantal cellen berekend.



- 10) Was de cellen 3 keer met PBS. Doe dit voorzichtig met de automatische multichannel pipet
- 11) Voeg 25 µl trypsine (1x) toe en incubeer 10 min bij 37°C bij 5% CO<sub>2</sub>
- 12) Controleer of de cellen los zijn van de bodem onder een microscoop
- 13) Voeg 75 µl DMEM-medium toe en meng goed
- 14) Verdun de celoplossingen en plaat 100 µl uit op YPD platen gebruik makend van steriele glaspapieren  
1/100 en 1/1000 verdunningen geven telbare platen
- 15) Incubeer de platen 48 uur bij 37°C bij normale atmosfeer
- 16) Tel het aantal cellen

## 2.4 Karakterisatie van *Candida albicans* in aanwezigheid van *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.4.1 Labelen van *Candida albicans* met GFP

Voor de karakterisatie van *C. albicans* in aanwezigheid van *S. cerevisiae* werd de *Candida*-stam gelabeld met GFP. Dit is een groen fluorescente proteïne dat wordt opgenomen in de cel waardoor deze een groene fluorescente kleur krijgt. Het doel is om een onderscheid te kunnen maken tussen de schimmelcellen en de gistcellen onder de microscoop en in de flowcytometer waarmee er werd gewerkt voor de verificatie van groei, filamentatie en adhesie.

Het labelen van *C. albicans* gebeurt in verschillende stappen. In de eerste stap werd het DNA van het GFP-proteïne geamplificeerd via PCR. Als eerste werd een plasmide die het GFP-proteïne bevat, getransformeerd in *Escherichia coli* of *E. coli* cellen en werden deze opgegroeid.

Materiaal: 3 ml proefbuizen, centrifuge, competente *E. coli* cellen, Eppendorf tube, ijs, incubator 37°C, LB amp, LB, schudincubator 37°C, warmteblok of waterbad van 42°C

Protocol *E. coli* transformatie:

- 1) Ontdooi de cellen op ijs
- 2) Voeg 1 µl plasmide DNA toe aan 100 µl competente *E. coli* cellen
- 3) Vortex kort
- 4) Laat 15-60 min op ijs
- 5) Heatshock voor 45 sec bij 42°C in een waterbad of warmteblok en plaats 2 min op ijs
- 6) Voeg 1 ml LB toe en breng over in een 3 ml proefbuis
- 7) Incubeer schuddend voor 40-60 min bij 37°C bij normale atmosfeer
- 8) Draai de cellen af en plaat uit op LB ampicilline platen
- 9) Incubeer overnacht bij 37°C bij normale atmosfeer

Als tweede werd het GFP-plasmide geëxtraheerd uit de *E. coli* cellen d.m.v. met de Nucleospin Plasmid EasyPure kit van Macherey-Nagel. Via PCR wordt het DNA van het GFP-proteïne geamplificeerd en nadien via gelelektroforese opgezuiverd gebruik makend van de Wizard SV Gel and PCR Clean-up kit van Promega.

Materiaal: Gelelektroforese, NucleoSpin Plasmid EasyPure kit van Macherey-Nagel, PCR, Wizard SV Gel and PCR Clean-up kit van Promega

Protocol:



H <sub>2</sub> O	12
------------------	----

- 2) Laat 2 tot 3 uur in een warmteblok bij 37°C
- 3) Voeg 2,5 µl FastAP buffer en 1,25 µl fastAP toe
- 4) Goed vortexen
- 5) Laat 15 min incuberen in warmteblok bij 37°C
- 6) Zuiver het opengeknipt CIp10 plasmide op via het Wizard SV Gel and PCR Clean-up kit van Promega
- 7) Bewaar het opengeknipt CIp10 plasmide in de vriezer op -20°C

Materiaal ligatie: CIp10 en GFP: Eppendorf tube, GFP-DNA, ijs, milliQ H<sub>2</sub>O, NEBuilder HiFi DNA assembly master mix, warmteblok, opengeknipt CIp10

Protocol ligatie CIp10 en GFP:

- 1) Maak de reactie op ijs volgens tabel 6:

Tabel 6: Reactiecomponenten ligatie.

	<b>Ligatie 2-3 fragmenten</b>	<b>Ligatie 4-6 fragmenten</b>
<b>Aanbevolen verhouding</b>	Vector : insert = 1 : 2	Vector : insert = 1 : 1
<b>Totale hoeveelheid fragmenten</b>	x µl (0,015-0,1 pmol)	x µl (0,1-0,25 pmol)
<b>NEBuilder Assembly master mix</b>	5 µl	5 µl
<b>MilliQ H<sub>2</sub>O</b>	5-x µl	5-x µl
<b>Totaal volume</b>	10 µl	10 µl

- 2) Incubeer de stalen bij 50°C voor 15 min (Ligatie 2-3 fragmenten) of 60 min (ligatie 4-6 fragmenten)
- 3) Bewaar de stalen op ijs

Deze volledige ligatiemix werd getransformeerd in *E. coli* cellen volgens het protocol hierboven vermeld.

De transformanten werden gecontroleerd via kolonie PCR met het TaKaRa Ex Taq DNA polymerase. Hieruit werden 3 transformanten gekozen en werd het CIp10-GFP plasmide opgezuiverd en opgestuurd voor sequencing ter controle. Het PCR-mengsel is gegeven in tabel 7. In tabel 8 is het PCR-programma weergegeven.

Tabel 7: PCR-mengsel TaKaRa Ex Taq DNA polymerase.

<b>Component</b>	<b>Aantal µl</b>
Template	< 200 ng
Voorwaartse primer (100 µM)	0,1
Achterwaartse primer (100 µM)	0,1
dNTP's (2,5 mM elk)	1,6
10x ExTaq buffer	2
ExTaq polymerase (5 units/µl)	0,1
Water	Tot 20

Tabel 8: PCR-programma TaKaRa Ex Taq DNA polymerase.

<b>Stap</b>	<b>Temperatuur</b>	<b>Tijd</b>
-------------	--------------------	-------------

Initiële denaturatie	98°C	30"	35 cycli
Denaturatie	98°C	10"	
Annealing	50-72°C	30"	
Elongatie	72°C	1' per kb	
Finale elongatie	72°C	2'	
Afkoeling	10°C	pauze	

Uiteindelijk werd het CIP10-GFP plasmide getransformeerd in de *C. albicans* cellen.

Materiaal *C. albicans* transformatie: 3 ml proefbuis, centrifuge, CIP10-GFP plasmide, Cutsmartbuffer, erlenmeyer, incubator, LiAc/TE: 1 ml LiAc (1M) + 1 ml TE (10x) + 8 ml milliQ H<sub>2</sub>O, milliQ H<sub>2</sub>O, PEG/LiAc/TE: 1 ml LiAc (1M) + 1 ml TE (10x) + 8 ml PEG 3350 (50%), SS DNA, *Stu I*, warmteblok, YPD, YPD Nourseo 200 platen

Protocol *C. albicans* transformatie:

- 1) Een *C. albicans*-kolonie wordt vanaf een YPD plaat geënt in proefbuisje met 3 ml YPD en overnacht schuddend geïncubeerd op 30°C bij normale atmosfeer
- 2) Ent 0,3-0,5 ml (OD 0,3-0,4) van de overnacht cultuur in 50 ml YPD (Erlenmeyer) en incubeer (schuddend) bij 30°C bij normale atmosfeer
- 3) Laat groeien tot de OD 3- 4 keer gestegen is (4-6 uur)
- 4) Draai de cellen af (5 min bij 3000 rpm)
- 5) Was de cellen met LiAc/TE
- 6) Resuspendeer de pellet in 0,6 ml LiAc/TE
- 7) Voeg 100 µl cellen toe aan 10 µl DNA voor transformatie  
Het CIP10-GFP wordt op voorhand gelineariseerd: Maak hiervoor de reactie en zet 2-3 uur op 37°C in een warmteblok volgens tabel 9

Tabel 9: Componenten lineariseren plasmide.

Component	Aantal µl
Plasmide	5
Cutsmartbuffer (10x)	1
<i>Stu I</i> restrictie-enzym	0,5
H <sub>2</sub> O	3,5

- 8) Voeg 10 µl ssDNA (10 mg/ml) toe (Eerst ssDNA 5 min bij 95°C in warmteblok)
- 9) Voeg 0,7 ml PEG/LiAc/TE toe
- 10) Vortex kort
- 11) Incubeer overnacht bij 30°C in een warmteblok, schuddend
- 12) Volgende dag, heatshock voor 2 uur bij 42°C (of 15 min bij 44°C)
- 13) Draai de cellen af (2 min bij 4000 rpm)
- 14) Resuspendeer de cellen in 2 ml YPD en incubeer schuddend voor 3-4 uur bij 30°C
- 15) Draai de cellen af en plaat uit op YPD nourseo 200

De getransformeerde *Candida*-cellen werden gecontroleerd via kolonie-PCR. Dat gebeurde analoog aan kolonie-PCR van de *E. coli*-transformanten met het TaKaRa Ex Taq DNA polymerase.

Ook het copy nummer van de transformanten werd bepaald via qPCR. Dit is het aantal plasmiden opgenomen per cel.

Materiaal: DNA isolatie (sectie 3.2.2), GoTaq qPCR Master mix (promega), Nanodrop, nuclease vrij water, primers

Protocol:

- 1) Isoleer het DNA zoals beschreven in sectie 3.2.2. Was de cellen 3 keer met 70% ethanol i.p.v. 1 keer
- 2) Los de cellen op in 100 µl nuclease vrij water
- 3) Meet de concentratie met behulp van de Nanodrop
- 4) Pas de concentratie aan naar 0,5 ng/µl in nuclease vrij water
- 5) Voer een qPCR uit met GoTaq qPCR Master mix (promega) volgens tabel 10-11. Voeg telkens 15 µl GoTaq mix toe in elke well + 5 µl van het 0,5 mg/µl DNA-staal

Tabel 10: Componenten GoTaq mix.

Component	Aantal µl
Go Taq qPCR	10
CXR	0,2
Primer mix	0,8
Nuclease vrij water	4
Totaal volume GoTaq mix	15

Tabel 11: Componenten primer mix.

Component	Aantal µl
Voorwaartse primer (100 µM)	10
Achterwaartse primer (100 µM)	10
Water	80

Voor *C. albicans* wordt het copy nummer gecontroleerd in de ACT1 promotor. Daarnaast worden ook nog 3 referentie genen getest. De gebruikte primers staan in onderstaande tabel 12.

Tabel 12: Primers voor qPCR met *C. albicans*.

	Primer koppels
<b>ACT1 promotor</b>	CaAct1: C2619-C2620
<b>ACT1 referentie</b>	CaACT1: 7039-7040
<b>18S referentie</b>	Ca18S: B8369-B8370
<b>TEF1 referentie</b>	CaTEF1: 7033-7034

- 6) Analyseer het resultaat

Hieruit kiest men 3 stammen met een gelijk copy nummer. Uit deze 3 stammen werd er via een fluorescentiemicroscopie bepaald welke het meest fluorescent is en welke stam dus meest geschikt is voor verdere experimenten.

#### 2.4.2 Verificatie van groei

Voor de verificatie van de groei werd OD<sub>600</sub> van het gelabelde Ca3153 na 24 uur gemeten in aanwezigheid van de verschillende giststammen. Er werd een collectie van *S. cerevisiae*-stammen uitgekozen waarbij de stammen een variatie in oorsprong hebben. De verschillende stammen zijn weergegeven in bijlage tabel 18.

Het percentage aan enerzijds *Candida*-cellen en anderzijds gistcellen werd gemeten met het flowcytometer toestel (Luminex Guava EasyCyte). Hieruit werd afgeleid of de giststammen een effect hebben op de groei.

Een flowcytometer gebruikt een lichtstraal, meestal een laser, om de concentratie aan cellen te meten. De vloeistof met cellen gaat langs de lichtstraal, precies één cel per keer, waardoor afhankelijk van vorm en fluorescentie meer of minder licht verstrooid wordt. Het verstrooide licht kan dan via een detector aangeven hoeveel cellen aanwezig zijn. In dit experiment zijn er twee soorten cellen, ten eerste de niet fluorescente gistcellen en ten tweede de fluorescente *Candida*-cellen. Deze cellen zullen een verschil geven in verstrooid licht waardoor er een onderscheid kan gemaakt worden en de exacte hoeveelheid van beide kan berekend worden. (21)

Het protocol voor de verificatie van de groei is analoog aan de groei met *Candida*-cellen. Hier werden de culturen verdund tot OD 0,1:0,3 *C. albicans* : *S. cerevisiae* en werd de concentratie 1 maal na 24 uur gemeten met de flowcytometer i.p.v. de spectrofotometer.

#### 2.4.3 Verificatie van filamentatie

In het eerste deel van het experiment werd nagegaan welke *Candida*-stammen (pseudo)hyfen vormden en welke niet. Hieruit werd een *Candida*-stam gekozen die snel en voldoende hyfen vormde voor de verificatie van de filamentatie in aanwezigheid van *S. cerevisiae*. Deze *Candida*-stam werd gelabeld met GFP om tijdens dit experiment het verschil te kunnen zien tussen de *Candida*-stam en de giststam onder de microscoop.

Ook hier werd analoog gewerkt aan het protocol van filamentatie met *Candida*-cellen. Er werd ook een concentratie van OD 0,1:0,3 *C. albicans* : *S. cerevisiae* gehanteerd. Na 6, 8, 24 en 48 uur werd de filamentatie onder de biologische microscoop nagegaan.

#### 2.4.4 Verificatie van adhesie

In dit experiment werd de *Candida*-stam samen met de giststam geënt in een 96-well plaat met HeLa cellen en 90 minuten geïncubeerd. Hierbij werd gekeken of de giststam zorgt voor inhibitie van de adhesie van de *Candida*-cellen aan de HeLa cellen. Indien dit het geval is, heeft de giststam mogelijk een positieve werking als probioticum.

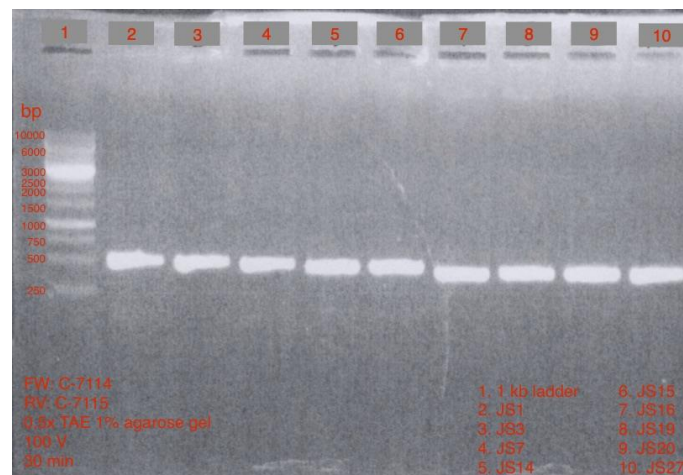
Het ontgooien en splitsen van de HeLa cellen gebeurt analoog aan het vorige experiment i.v.m. adhesie.

Ook het eigenlijke experiment gebeurt analoog aan het vorige experiment i.v.m. adhesie. De verhouding was OD 0,1:0,3 *C. albicans* : *S. cerevisiae*. Na incubatie werden de cellen 1/2 verdund en werd de concentratie gemeten met de flowcytometer.



<b>JS14</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>JS15</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>JS16</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>JS19</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>JS20</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>JS27</b>	<i>Candida albicans</i>

In figuur 8 is de controle van de gelelektroforese van reeks 2 weergegeven. Hierbij ligt elk bandje ter hoogte van 500bp wat overeen komt met het PCR fragment met ITS primers van *C. albicans*.



Figuur 8: Identificatie reeks 2 gelelektroforese.

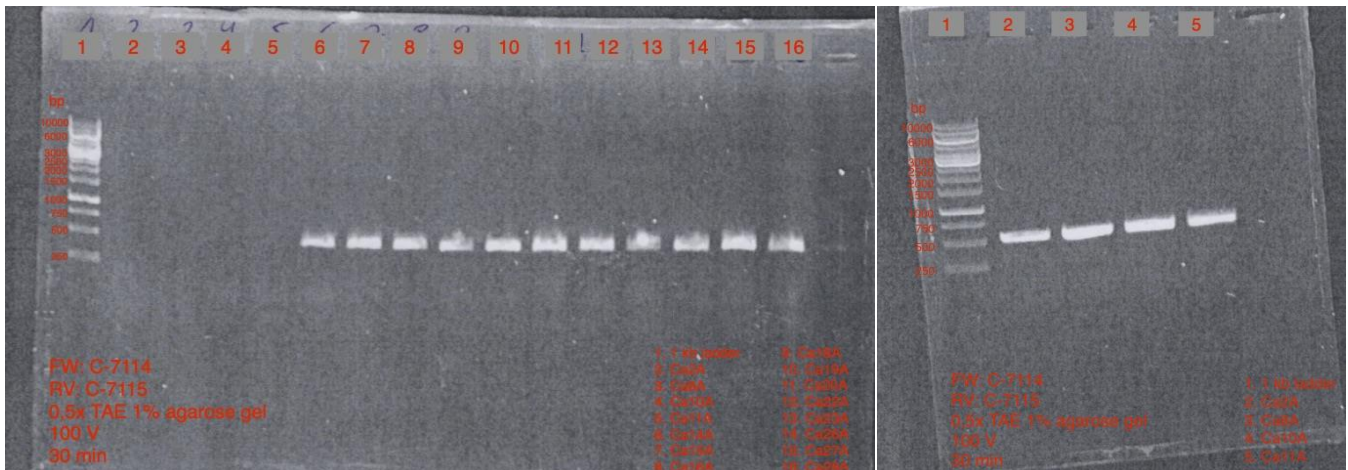
Tabel 16: Identificatie reeks 3.

<b>Ca2A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca8A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca10A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca11A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca14A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca15A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca16A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca18A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca19A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca20A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca22A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca23A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca26A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca27A</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>Ca28A</b>	<i>Candida albicans</i>

In figuur 9 (links) zijn de controles van de gelelektroforese weergegeven van reeks 3. Ook hier liggen de bandjes bij 536 bp wat overeenkomt met het PCR product van *C. albicans*. In lijn 2 tot 5 zijn er geen bandjes. Bij deze stalen is er iets misgelopen en werd later opnieuw een



PCR en controle uitgevoerd. Deze zijn te zien in figuur 9 (rechts). Ook hier komen de bandjes overeen met het PCR product van *C. albicans*.



Figuur 9: Identificatie reeks 3 gelelektroforese.

## 3.2 Karakterisatie van vaginale *Candida*-isolaten

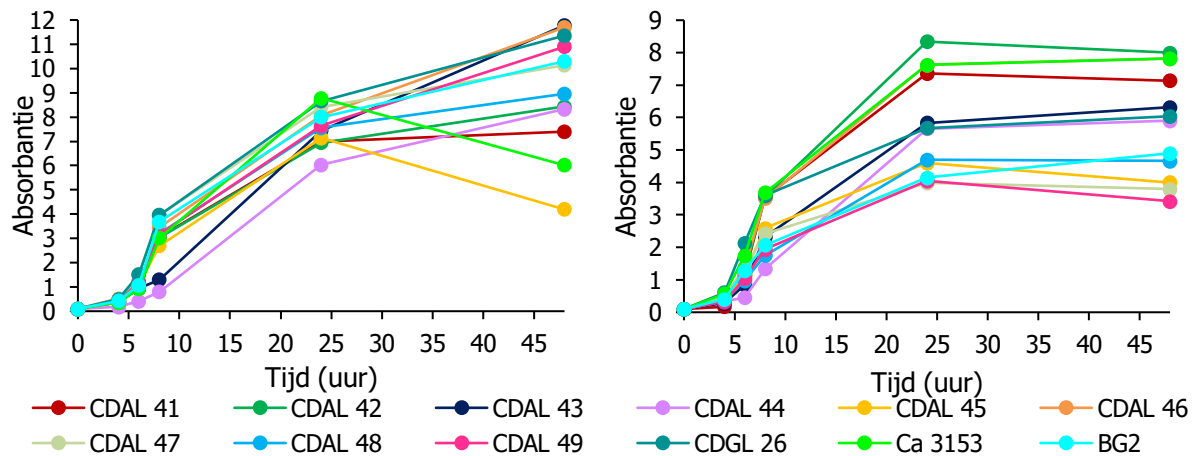
### 3.2.1 Groei in VSM- en RPMI-medium

De groei van de *Candida*-isolaten werd nagegaan enerzijds via een handmatige methode, hierbij werd de absorbantie in functie van de tijd gemeten en werd een groeicurve opgesteld. Anderzijds werd de groei nagegaan via de Multiskan waarbij de absorbantie voor 48 uur elk half uur gemeten werd, waarna ook een groeicurve werd opgesteld.

In figuur 10 zijn de groeicurven van de handmatige methode van reeks 1 in enerzijds VSM en anderzijds RPMI weergegeven. De exacte OD-waarden staan in bijlagen tabel 19-20.

In VSM is CDAL43 de stam met de hoogste absorbantie, gevolgd door CDAL46 en CDGL26. Bij elke stam, uitzonderlijk Ca3153 en CDAL45, blijft de absorbantie stijgen in functie van de tijd. Ca3153 en CDAL45 geven na 24 uur een daling van de absorbantie.

In RPMI hebben CDGL26, Ca3153 en CDAL41 de hoogste absorbantie. Na 24 uur blijven de waarden ongeveer gelijk of is er een lichte daling. Met uitzondering op BG2, deze stam kent nog een lichte stijging in zijn curve.

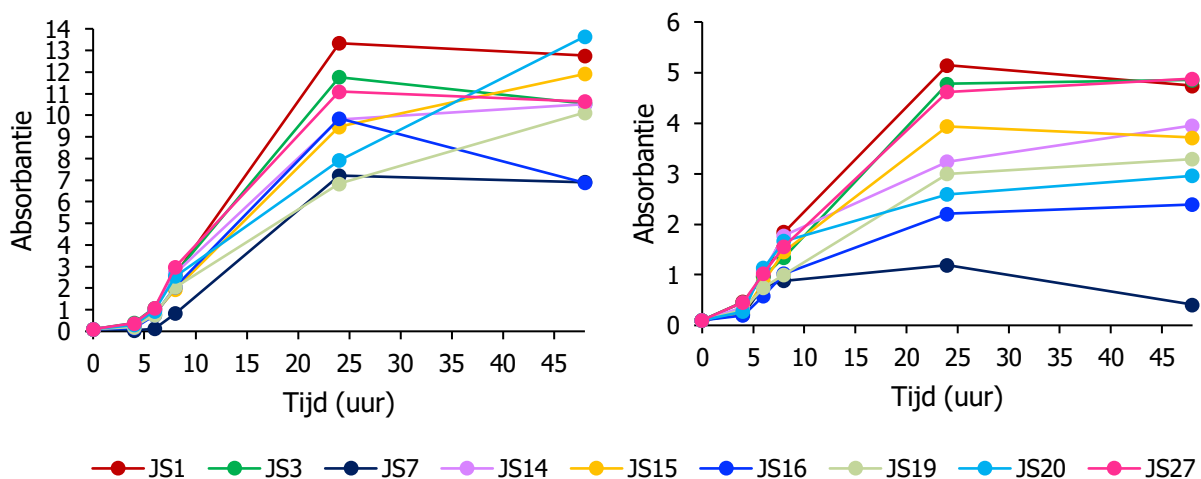


Figuur 10: Groeicurve handmatige methode reeks 1 in VSM (links) en RPMI (rechts).

In figuur 11 is zijn de groeicurven van de handmatige methode in VSM en RPMI van reeks 2 weergegeven. De exacte OD-waarden staan in bijlagen tabel 21-22.

In VSM hebben de stammen JS20, JS1 en JS15 na 48 uur de hoogste absorbantie. De stammen JS1, JS3, JS7, JS16 en JS27 stijgen niet meer na 24 uur met zelfs een lichte daling van de absorbantie na 48 uur. De andere stammen, JS14, JS15, JS19 en JS20 kennen wel nog een stijging, met JS20 de steilste.

In RPMI zijn JS27, JS3 en JS1 de koplopers. Tussen 24 en 48 uur blijven alle stammen nagenoeg constant, met uitzondering van JS7. Deze stam heeft een meer uitgesproken daling in zijn absorbantie.

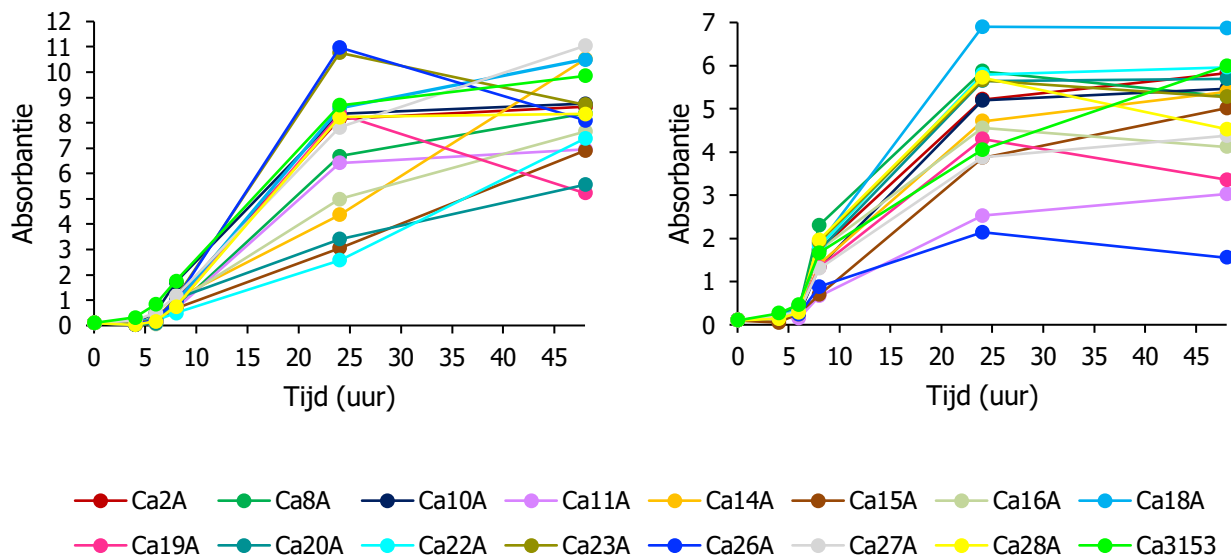


Figuur 11: Groeicurve handmatige methode reeks 2 in VSM (links) en RPMI (rechts).

In figuur 12 zijn de groeicurven van de handmatige methode in VSM en RPMI van reeks 3 weergegeven. De exacte OD-waarden staan in bijlagen tabel 23-24.

In VSM heeft Ca27A, gevolgd door Ca18A en Ca14A de hoogste absorbantie-waarden. De stammen Ca19A, Ca26A en Ca26A geven na 24 uur een daling in de groei.

In RPMI heeft Ca18A de hoogste absorptantie, daarna Ca22A en Ca2A. Na 24 uur valt op dat de meeste stammen constant blijven, Ca15A en de referentiestam Ca3153 stijgen wel, Ca19A en Ca26A kennen zoals in VSM een daling.



Figuur 12: Groeicurve handmatige methode reeks 3 in VSM (links) en RPMI (rechts).

In het algemeen wordt er vastgesteld dat de stammen in VSM tot hogere OD-waarde groeien dan in RPMI. Ook de stammen met de hoogste OD-waarde in VSM zijn niet bepaald de stammen met de hoogste OD-waarde in RPMI.

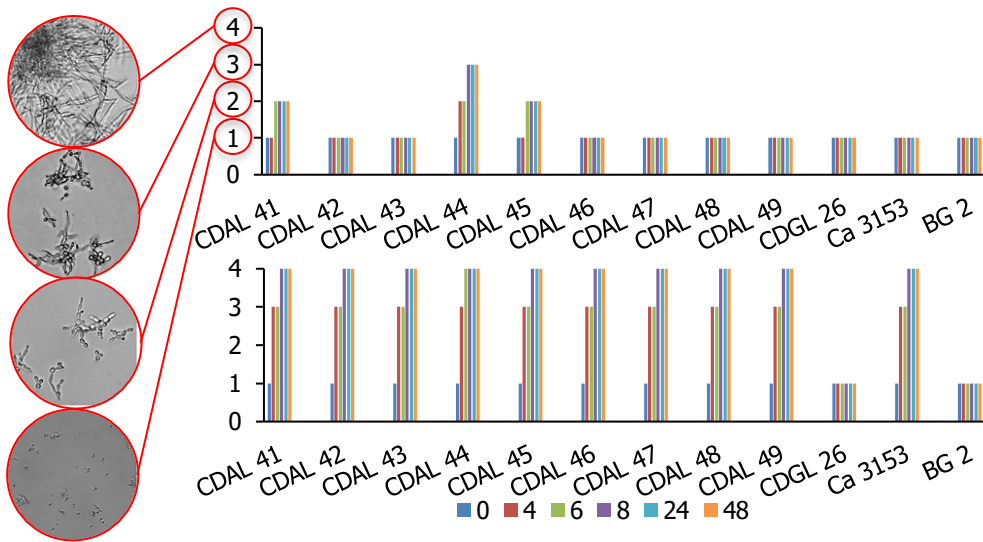
De groeicurven van reeks 1, 2 en 3 opgesteld via de Multiskan zijn weergegeven in figuur 26 tot 28 in bijlagen. Bij deze curven valt op dat na een bepaalde tijd de absorptantie constant blijft. Dit is bij elke stam die gemeten werd.

### 3.2.2 Filamentatie in VSM en RPMI met serum

De isolaten werden getest op filamentatie in VSM met serum en RPMI met serum. De culturen werden opgegroeid en na 4, 6, 8, 24 en 48 uur werd de filamentatie gecontroleerd onder de microscoop. Er werd telkens een onderscheid gemaakt tussen geen hyfen (niveau 1), pseudohyfen (niveau 2), weinig hyfen (niveau 3) en veel hyfen (niveau 4). Deze niveaus zijn visueel weergegeven in figuur 13 samen met de resultaten van reeks 1.

In VSM zijn er twee isolaten (CDAL41 en CDAL45) die na 6 uur pseudohyfen vormen, één isolaat, CDAL44, vormt na 4 uur al pseudohyfen en na 8 uur een beperkt aantal hyfen. De andere stammen vormen geen pseudohyfen of hyfen.

In RPMI vormen alle stammen vanaf 4 uur hyfen, uitgezonderd CDGL26 en BG2. Deze 2 isolaten zijn geïdentificeerd als *C. glabrata*, ze hebben niet de eigenschap om hyfen te vormen.

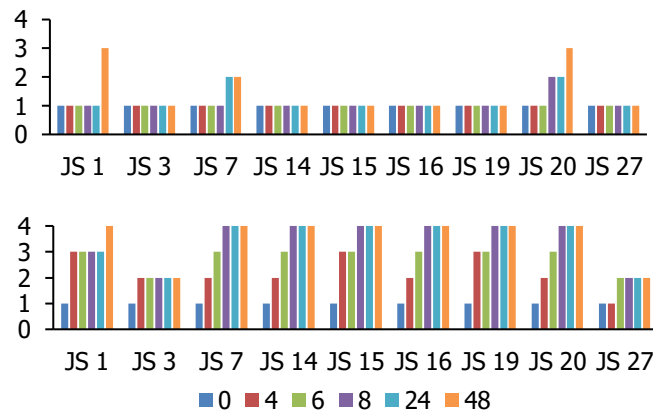


Figuur 13: Filamentatie reeks 1 in VSM (boven) en RPMI (onder).

In figuur 14 zijn de resultaten van de filamentatie van reeks 2 weergegeven.

In VSM vormt de stam JS20 na 8 uur pseudohyfen en na 48 uur beginnen er zich een klein aantal hyfen te vormen. Bij JS1 zijn er na 48 uur ook een aantal hyfen te zien. JS7 vormt na 24 uur pseudohyfen. De andere stammen vormen in VSM geen (pseudo)hyfen.

In RPMI vormt elke stam op een bepaald moment hyfen, uitgezonderd JS3 en JS27. Deze stammen komen niet verder dan pseudohyfen na 48 uur.

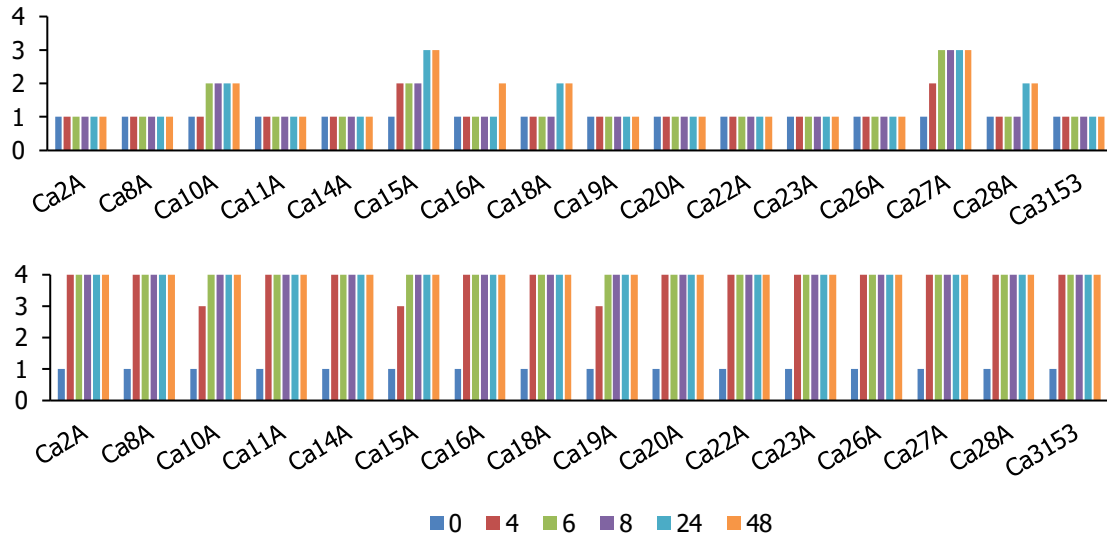


Figuur 14: Filamentatie reeks 2 in VSM (boven) en RPMI (onder).

In figuur 15 zijn de resultaten van reeks 3 weergegeven.

In VSM vormen Ca10A, Ca15A, Ca16A, Ca18A, Ca27A en Ca28A op zijn minst pseudohyfen. Ca15A en Ca27A vormen respectievelijk na 24 en 6 uur een beperkt aantal hyfen.

In RPMI vormt elke stam in reeks 3 hyfen na 4 of 6 uur.



Figuur 15: Filamentatie reeks 3 in VSM (boven) en RPMI (onder).

### 3.2.3 Adhesie aan menselijke HeLa cellen

De isolaten werden getest op adhesie aan menselijke HeLa cellen. De *Candida*-cellen werden toegevoegd aan een 100% confluyente 96-well plaat met HeLa cellen en geïncubeerd voor 90 minuten. Hierna werden de geadheerde cellen losgemaakt, verdund en uitgeplaat om het aantal gevormde kolonies te tellen.

In tabel 25, 26 en 27 in bijlagen zijn de resultaten weergegeven voor respectievelijk reeks 1, 2 en 3. In de tweede kolom staan de hoeveelheid geadheerde cellen in het aantal kolonies per plaat. Er werden telkens 3 technische repeats uitgevoerd en hiervan werd een gemiddelde berekend via onderstaande formule. Een voorbeeld is weergegeven voor CDAL41.

$$\frac{(\#kolonies\ plaat\ 1 + \#kolonies\ plaat\ 2 + \#kolonies\ plaat\ 3)}{3} = \text{gemiddeld } \# \frac{\text{kolonies}}{\text{plaat}}$$

$$\frac{(481 + 354 + 409)}{3} = 415 \frac{\text{kolonies}}{\text{plaat}}$$

De derde kolom geeft de hoeveelheid geadheerde cellen in cellen per ml. Er werd telkens 100 µl uitgeplaat van een 1/100 1 ml verdunning. Er werd dus 1000 maal verdund.

$$\# \frac{\text{kolonies}}{\text{plaat}} * 1000 = \# \frac{\text{cellen}}{\text{ml}}$$

$$415 \frac{\text{kolonies}}{\text{plaat}} * 1000 = 415000 \frac{\text{cellen}}{\text{ml}}$$

Er werd ook nagegaan hoeveel cellen er voor elke stam worden toegevoegd. In de vierde kolom wordt het aantal cellen toegevoegd in het aantal kolonies per plaat weergegeven. In de vijfde kolom werd dit omgerekend naar het aantal cellen per ml. Hier werd 100 µl van een 2 maal 1/100 1 ml verdunning uitgeplaat. Er werd dus 100000 verdund.

$$\# \frac{\text{kolonies}}{\text{plaat}} * 100000 = \# \frac{\text{cellen}}{\text{ml}}$$

$$246 \frac{\text{kolonies}}{\text{plaat}} * 100000 = 24600000 \frac{\text{cellen}}{\text{ml}}$$

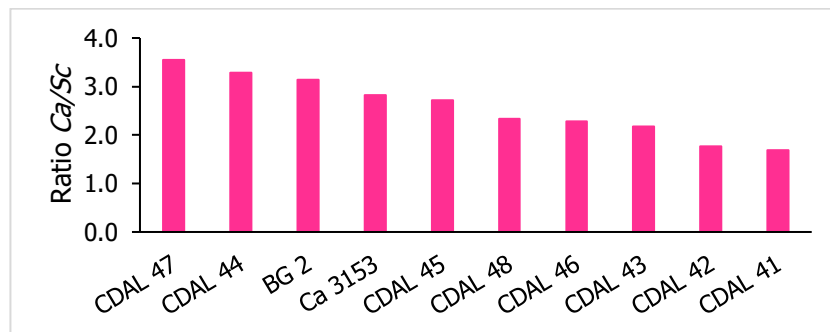
In de laatste kolom wordt de procentuele verhouding geadheerde cellen op toegevoegde cellen weergegeven.

$$\frac{\text{Hoeveelheid geadheerde cellen/ml}}{\text{Hoeveelheid toegevoegde cellen/ml}} * 100\% = \% \text{ hoeveelheid geadheerd}$$

$$\frac{415000 \text{ cellen/ml}}{24600000 \text{ cellen/ml}} * 100\% = 1,69\%$$

In figuur 16 zijn de top 10 isolaten weergegeven met de grootste procentuele verhouding geadheerde cellen. Deze zijn ook aangeduid in tabel 25-27.

De *Candida*-stam CDAL47 heeft de grootste procentuele verhouding van 3,55% gevolgd door CDAL44 en de twee referentiestammen. Op plaats 5 tot 10 staan respectievelijk CDAL45, CDAL48, CDAL46, CDAL43, CDAL42 en CDAL41.



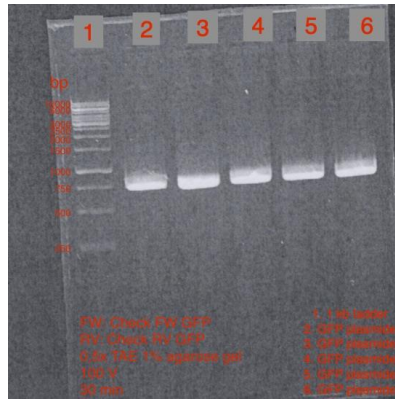
Figuur 16: Top 10 adhesie aan menselijke HeLa cellen.

### 3.3 Analyse van anti-*Candida*-eigenschappen van geselecteerde *Saccharomyces cerevisiae*-isolaten

#### 3.3.1 Labelen van *Candida albicans* met GFP

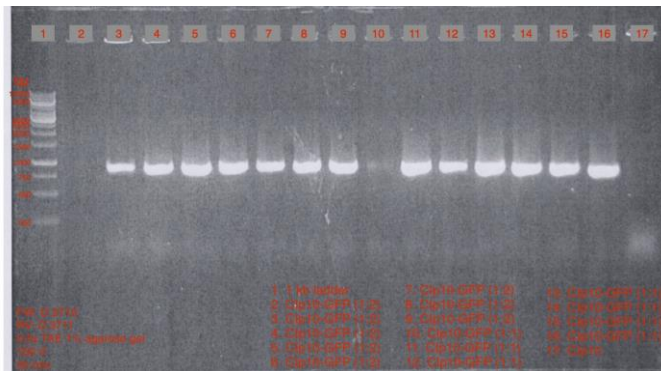
Het labelen van de *Candida*-stam met het fluorescente proteïne GFP gebeurde in verschillende stappen. Eerst werd een plasmide dat het GFP bevat getransformeerd in *E. coli*-cellen. Na het opgroeien werd dit plasmide geëxtraheerd en geamplificeerd via PCR en werd het GFP via gelelektroforese opgezuiverd. De controle van de gel is weergegeven in figuur 17.

De bandjes met een lengte van ongeveer 750 bp komen overeen met de bandjes van het GFP. Dit zijn de bandjes die werden uitgesneden.



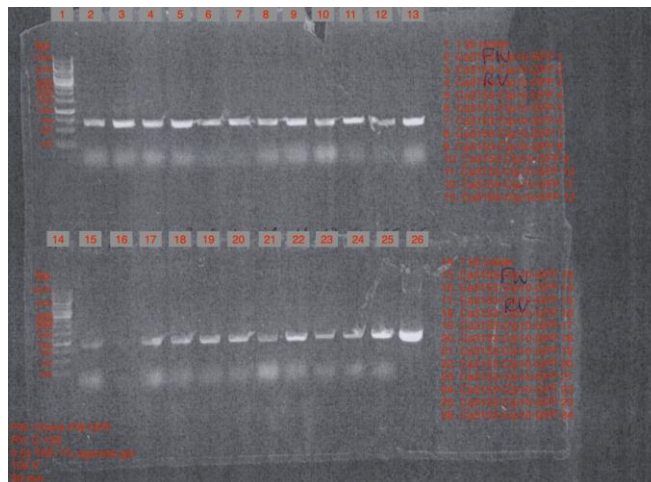
Figuur 17: Gelelektroforese GFP.

Het opgezuiverde GFP werd geïntegreerd in het CIP10-plasmide, waarna het volledige CIP10-GFP-plasmide getransformeerd werd in *E. coli*. Via kolonie-PCR en gelelektroforese werd er een controle uitgevoerd waaruit 3 kolonies gekozen werden om het CIP10-GFP op te zuiveren. De controle van de gelelektroforese is weergegeven in figuur 18.



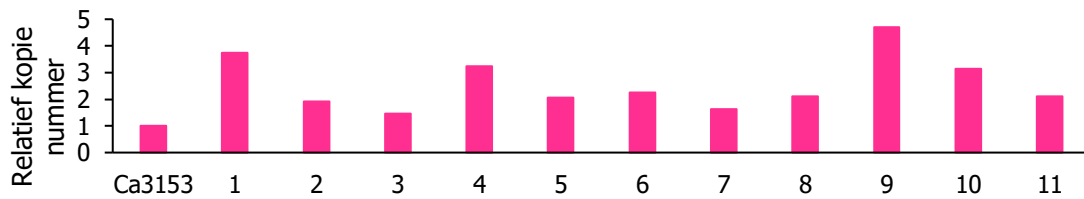
Figuur 18: Gelelektroforese kolonie PCR transformanten *E. coli* met CIP10-GFP.

Het opgezuiverde CIP10-GFP-plasmide werd uiteindelijk getransformeerd in de *C. albicans*-stam. Hier werd ook een controle uitgevoerd via kolonie PCR en gelelektroforese. Deze laatste is weergegeven in figuur 19.



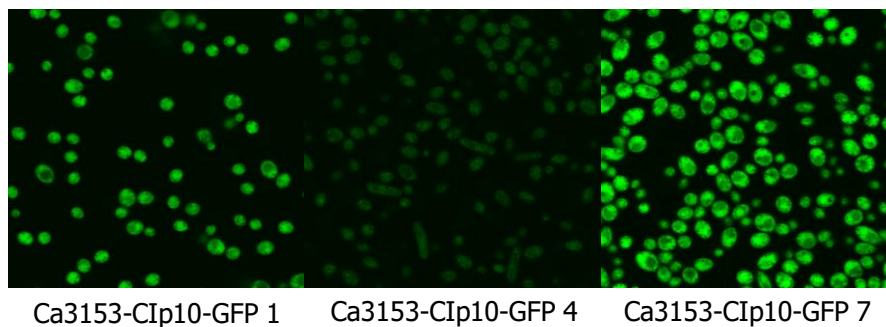
Figuur 19: Gelelektroforese kolonie PCR transformanten Ca3153-CIP10-GFP.

Ook het kopie nummer van de getransformeerde kolonies werd bepaald via qPCR. De relatieve kopie nummers t.o.v. de referentie Ca3153 zijn weergegeven in figuur 20.



Figuur 20: Relatieve kopie nummers Ca3153-CIp10-GFP.

Hieruit werden 3 stammen gekozen met een relatief kopie nummer van 4, 3 en 2. Van deze stammen werd uiteindelijk de intensiteit van de fluorescentie bekeken onder de fluorescentiemicroscopie. In figuur 21 zijn de microscopische foto's weergegeven van Ca3153-CIp10-GFP 1, 4 en 7. Hierbij heeft nummer 7 de meest intense weergave gevolgd door 1 en dan 4.



Figuur 21: Foto's fluorescentie Ca3153-CIp10-GFP 1, 4 en 7.

### 3.3.2 Verificatie van groei

De *Candida*-stam Ca3153-CIp10-GFP 7 werd opgegroeid in VSM en RPMI in aanwezigheid van de verschillende *S. cerevisiae*-stammen in een verhouding 1:3 *Ca:Sc*. Na 24 uur werd het percentage aan schimmel- en gistcellen gemeten en de verhouding berekend. Indien meer schimmelcellen en dus minder gistcellen aanwezig zijn, zal deze verhouding groter worden.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 28 in bijlagen. Figuur 22 is een grafische weergave van de tien giststammen met de beste inhibitorische werking voor VSM en RPMI. Deze zijn aangeduid in tabel 28 in bijlagen.

Een voorbeeld van de berekeningen is weergegeven voor S288c in VSM.

Na 24 uur werd het percentage schimmel- en gistcellen gemeten in tweevoud. Hiervan werd het gemiddelde berekend.

$$\text{Gemiddeld percentage Ca} = \frac{16,16\% + 15,95\%}{2} = 16,06\%$$



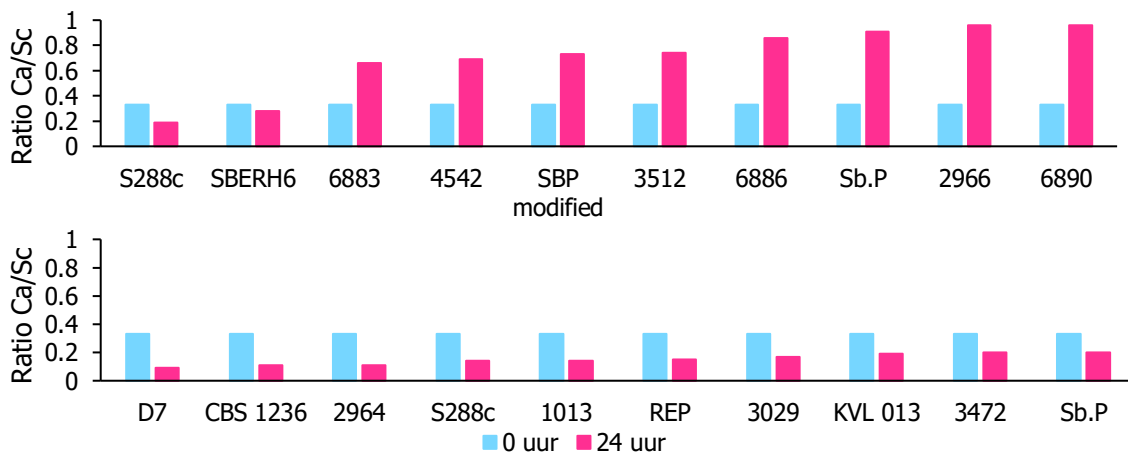
$$\text{Gemiddeld percentage } Sc = \frac{83,78\% + 84,00\%}{2} = 83,89\%$$

Hiervan werd de verhouding berekend.

$$\frac{Ca}{Sc} = \frac{16,06\%}{83,89\%} = 0,19$$

In VSM zijn de stammen S288c en SBERH6 de giststammen met de kleinste verhouding  $Ca/Sc$  na 24 uur. Dit zijn eveneens ook de enige stammen die de hoeveelheid schimmelcellen effectief doet dalen in 24 uur tijd. Bij elke andere giststam is de verhouding na 24 uur groter dan deze na 0 uur. Hierbij bleven de schimmelcellen dus wel groeien in kleinere of grotere mate.

In RPMI zijn er 20 stammen die de hoeveelheid *Candida* doen dalen na 24 uur. De stammen met de beste inhibitorische werking zijn D7, CBS 1236, 2964, S288c, 1013, REP, 3029, KVL 013, 3472 en Sb.P. De overige 49 stammen doen het percentage *Candida* niet dalen na 24 uur.

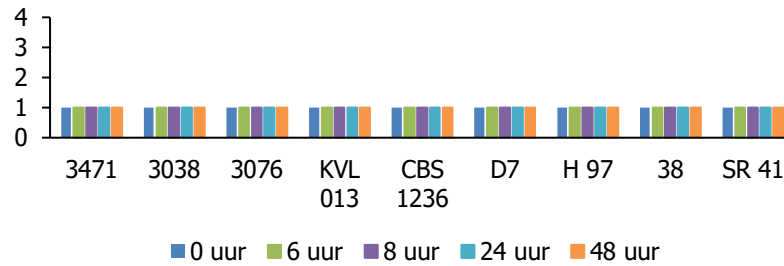


Figuur 22: Verificatie van de groei in VSM (boven) en RPMI (onder).

### 3.3.3 Verificatie van filamentatie

De filamentatie van de *Candida*-stam Ca27A-CIp10-GFP 19 werd microscopisch nagegaan in aanwezigheid van de verschillende giststammen na 6, 8, 24 en 48 uur op te groeien in VSM. De resultaten zijn grafisch weergegeven in figuur 29 in bijlage.

In figuur 23 zijn de resultaten van de giststammen weergegeven die voor een volledige inhibitie van filamentatie zorgen na 48 uur. Dit zijn de stammen 3471, 3038, 3076, KVL 013, CBS 1236, D7, H 97, 38 en SR41. De overige giststammen zorgen niet voor een volledige inhibitie na 48 uur.

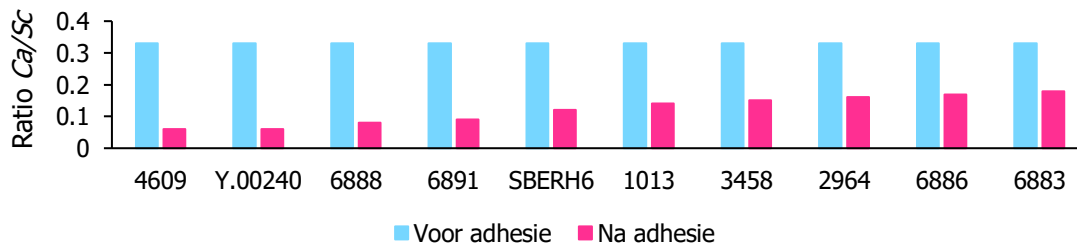


Figuur 23: Verificatie van filamentatie in VSM giststammen volledige inhibitorische werking.

### 3.3.4 Verificatie van adhesie

De adhesie van de *Candida*-stam Ca3153-CIp10-GFP 7 werd nagegaan in aanwezigheid van de verschillende giststammen in VSM. De cellen werden toegevoegd aan HeLa cellen in de verhouding 1:3 *Ca:Sc* en na 90 minuten incubatie werd het percentage aan geadheerde schimmelcellen en gistcellen bepaald.

De resultaten van alle giststammen zijn weergegeven in tabel 29 in bijlagen. De berekeningen gebeurde analoog aan sectie 4.3.2. Ook hier geldt: hoe kleiner de verhouding *Ca/Sc* na adhesie, hoe beter de giststam de adhesie van de schimmelcellen geïnhibeerd heeft. De stam met de beste werking is 4609, gevolgd door Y.00240 en 6888. Nadien volgen 6891, SBERH6, 1013, 3458, 2964, 6886 en 6883 met ook een redelijk lage ratio *Ca/Sc*. Deze zijn weergegeven in figuur 24 en aangeduid in tabel 29 in bijlagen.



Figuur 24: Verificatie van adhesie in VSM.

## 4 Discussie

### 4.1 Collecteren van vaginale *Candida*-isolaten

De vaginale *Candida* isolaten werden via DNA-isolatie en ITS sequencing geïdentificeerd. Hieruit blijkt dat de *Candida*-stammen effectief van de soort *albicans* en *glabrata* zijn. De isolaten onderzocht in dit project zijn afkomstig van de vaginale niche. Andere isolaten uit andere niches kunnen andere virulentie eigenschappen bezitten. Hier is dus een partiële screening gebeurd en de besluiten kunnen niet doorgetrokken worden naar andere isolaten uit andere niches.

### 4.2 Karakterisatie van vaginale *Candida*-isolaten

Een *Candida*-schimmelcel heeft de mogelijkheid om als commensaal of als infectie aanwezig te zijn in de vaginale niche. Er zijn drie belangrijke virulentiefactoren: de groei in de vaginale niche, vorming van filamentatie en adhesie aan de cellen van de gastheer. Deze factoren zorgen ervoor dat de schimmelcel een infectie veroorzaakt. Hoe beter de cel een factor naar boven laat komen, hoe meer infectieus de schimmelcel is.

Ten eerste werden de verschillende vaginale *Candida*-isolaten getest op groei in VSM en RPMI als controle. De OD-waarde werd gemeten na 4, 6, 8, 24 en 48 uur. Indien een schimmelcel zich sneller vermenigvuldigt, zullen er meer cellen aanwezig zijn in de cultuur en zal de cultuur een hogere dichtheid hebben. De gemeten absorbantie of optische densiteit zal hierbij groter zijn. De stammen met de hoogste OD-waarde zijn dus meer waarschijnlijk infectieus. De *Candida*-stam met de hoogste OD-waarde na 48 uur is JS20 met een absorbantie van 13,645. Deze wordt gevolgd door JS1, JS15, CDAL43 en CDAL46 met respectievelijk een absorbantie van 12,75; 11,912; 11,78 en 11,7.

De isolaten werden ook getest op groei in de Multiskan. De isolaten vertonen na een bepaald aantal uur geen verdere groei meer. Een mogelijke verklaring is het verschil in aanwezigheid van zuurstof. De 96-well plaat in de Multiskan is afgedekt met een folie en bevat weinig zuurstof. In de schudincubator is dit niet het geval. Uit deze resultaten kan geen besluit genomen worden.

Verschillende klinische isolaten, met oorsprong in verschillende niches (bv. bloedstroom, huid, vagina, darmen, etc) hebben verschillende eigenschappen. Ze zijn aangepast aan groei in hun eigen specifieke omgeving. Het metaboliseren van nutriënten wordt anders uitgevoerd en geregeld in de cel. Vaginale isolaten zijn waarschijnlijk beter aangepast om nutriënten uit VSM te metaboliseren. Dit verklaart het verschil tussen de groei in VSM en RPMI. VSM bevat onder andere melkzuur en azijnzuur, en heeft een pH van 4,2. RPMI heeft een meer neutrale pH van 7.

Ten tweede werd de hoeveelheid filamentatie beoordeeld. De schimmelcel vormt schimmeldraden of hyfen, en hiermee dringt hij het weefsel van de gastheer binnen om een infectie te veroorzaken. Hoe meer filamentatie er gevormd wordt, hoe beter de schimmelcel het weefsel kan binnendringen. De stammen met de meeste filamentatievorming hebben de grootste infectiviteit. Dit is op de eerste plaats de *Candida*-stam Ca27A. Deze vormt na 4 uur al pseudohyfen en na 6 uur beginnen er reeds echte hyfen te vormen. Er worden ook hyfen gevormd bij CDAL44 na 8 uur, Ca15A na 24 uur en JS20 en JS1 na 48 uur.

Ook hier is een groot verschil te zien tussen de vorming van filamentatie in enerzijds VSM en anderzijds RPMI. In RPMI, het medium dat het bloed nabootst, vormt elke *C. albicans*-stam hyfen. De bloedstroom is een beweeglijk niche, niet zoals de vaginale omgeving. De schimmelcellen hebben hier een sterker mechanisme nodig om een infectie te kunnen veroorzaken. In RPMI kunnen ze deze eigenschap dus beter naar voor laten komen. De *C. glabrata*-stammen vormen geen hyfen, ze bezitten de eigenschap niet.

Als laatste werd ook de adhesie van de cellen nagegaan aan humane cellen. Ook hier geldt, hoe sterker de adhesie, hoe hoger de infectiviteit. De stammen die na 90 minuten incubatie (relatief t.o.v. het aantal toegevoegde cellen) de meest geadheerde cellen hebben zijn CDAL47 waarbij 3,55% van de toegevoegde cellen adheerde, CDAL44 met 3,29%, de referentiestam Ca3153 met 2,82%, CDAL45 met 2,71% en CDAL48 met 2,34%.

Een schimmelcel scoort best op alle drie virulentiefactoren goed. Op deze manier kan de cel het best een infectie veroorzaken in de vaginale niche.

JS20, de stam die het best groeit in VSM, vormt ook een klein aantal hyfen na 48 uur. Hier valt wel op dat deze stam maar een adhesie vertoont van 0,2% van de toegevoegde cellen. Dit geldt ook voor de stam JS1. Deze stam groeit na JS20 het best, vormt ook hyfen na 48 uur maar heeft een lage procentuele waarde voor de adhesie van 0,86%. JS15, CDAL43 en CDAL46 hebben naast het feit dat ze een goede groei hebben in VSM, in de andere virulentiefactoren een relatief lage score.

Ca27A vormt al hyfen na 6 uur in VSM. Deze stam heeft voor de groei na 48 uur in VSM een absorbantie van 11,04. Dit is een relatief hoge OD-waarde. Ca27A scoort laag in de adhesie test, met een waarde van 0,38% geadheerde cellen. CDAL44 vormt filamentatie na 8 uur, een absorbantie van 8,332 na 48 uur groei in VSM en een adhesie van 3,29%. Deze stam scoort goed op filamentatie en adhesie, en heeft een relatief goede score op de groei. Ca15A vormt ook hyfen na 24 uur. Maar deze stam scoort relatief laag op groei in VSM en adhesie.

CDAL47, de stam die de hoogste procentuele waarde van geadheerde cellen heeft, heeft ook een goede OD-waarde van 10,14 na 48 uur in VSM. De stam vormt geen (pseudo)hyfen na 48 uur. Ca3153, CDAL45 en CDAL48 scoren goed op adhesie maar hebben een relatief lage OD-waarden na 48 uur in VSM en vormen maximaal pseudohyfen na 48 uur in VSM.

De waarden van de *Candida*-stam CDAL44 liggen bij alle virulentiefactoren hoog. Deze stam heeft de grootste kans om een infectie te veroorzaken en is dus het meest virulent.

Daarbuiten hebben de *Candida* stammen JS20 en JS1 een hoge OD-waarde en vormen zij hyfen na 48 uur, maar hebben ze niet de mogelijkheid om te adheren aan de gastheercellen. Door adhesie kan de *Candida* stam zich initieel koloniseren om later de gastheercellen te infecteren. Dit is een belangrijke stap in het proces, hierdoor zullen de stammen JS20 en JS1 minder virulent zijn dan CDAL44. Ook de stam Ca27A heeft hetzelfde probleem.

### 4.3 Karakterisatie van *Candida albicans* in aanwezigheid van *Saccharomyces cerevisiae*

Dezelfde drie virulentiefactoren werden getest in aanwezigheid van verschillende *S. cerevisiae*-stammen. Er werd al eerder aangetoond dat *S. cerevisiae* kan dienen als een goed probioticum voor de bestrijding van VVC. In dit onderzoek wordt nagegaan welke van de verschillende giststammen het grootste effect heeft. Dit effect wordt bekomen door de vermindering van groei, filamentatie of adhesie van de schimmelcellen te bewerkstelligen.

De *Candida*-stam werd gelabeld met GFP. Op deze manier konden de *S. cerevisiae*-stammen op een meer high-throughput wijze gescreend worden.

Voor de verificatie van groei werden de giststammen samen met de referentiestam Ca3153 opgegroeid voor 24 uur in VSM. Na 24 uur werd de hoeveelheid *Candida*-cellen t.o.v. gistcellen gemeten. Hieruit blijkt dat de giststammen S288c en SBERH6 de hoeveelheid *Candida*-cellen doen verlagen van een ratio van 0,33 naar respectievelijk 0,19 en 0,28. In aanwezigheid van elke andere giststam blijft *Candida* in minder of meerdere mate groeien. De stammen 6883 met 0,66, 4542 met 0,69 en SBP modified met 0,73 sluiten de top 5.

Voor de verificatie van filamentatie werden de stalen na 6, 8, 24 en 48 groei in VSM gecontroleerd onder de microscoop. De gistcellen produceren bepaalde stoffen die de productie van SAP's tegengaan. SAP's zijn stoffen geproduceerd door de schimmelcellen om de vorming van filamentatie te bevorderen. Hoe meer deze tegengewerkt worden, hoe langer de vorming van hyfen uitblijft, hoe beter de giststam inwerkt op de *Candida*-cellen. Deze stam zal dus de beste eigenschappen hebben om te dienen als probioticum tegen VVC. De giststammen 3471, 3038, 3076, KVL 013, CBS 1236, D7, H 97, 38 en SR41 zorgen voor een volledige inhibitie van filamentatie en zullen dus op vlak van filamentatie een goed probioticum zijn. Andere giststammen laten toch nog een vorm van hyfen toe en hebben dus minder goede eigenschappen.

Voor de verificatie van adhesie aan menselijke cellen werd na incubatie de hoeveelheid gistcellen en schimmelcellen gemeten. De gistcellen gaan in competitie met de schimmelcellen. De verhouding van *Candida*/gist werd berekend en vergeleken met de beginverhouding. Indien de verhouding *Candida*/gist daalt, zijn er na adhesie meer gistcellen aanwezig en is de giststam een goede inhibitor. De *Candida* stam 4609 heeft de kleinste verhouding van 0,059 en is dus het beste probioticum o.b.v. adhesie. De stammen Y.00240 met verhouding 0,061, 6888 met 0,08, 6891 met 0,09 en SBERH6 met 0,012 volgen hierop. Verder zijn er nog 19 stammen die de hoeveelheid *Candida* doen verlagen, dit wil zeggen dat de verhouding lager is dan de beginverhouding van 0,33. De andere giststammen doen dit niet.

Ook hier zal de meest belovende giststam best goed scoren op de drie verschillende testen. Hier valt op dat geen enkele giststam goede inhibitorische eigenschappen vertoont op alle drie testen. Er zijn wel enkele stammen die op twee van de drie een goed resultaat vertonen. De giststammen zijn evolutionair niet bedoeld om in de vaginale niche als probioticum te dienen. Het is dus ook verwacht dat geen enkele stam op alle drie vlakken kan inwerken.

De giststam SBERH6 heeft enerzijds voor de groei en de adhesie een kleine verhouding *Candida*/gist. Dit is ook het geval bij de giststammen 6886 en 6883. Anderzijds hebben de stammen geen goede inwerking op de filamentatie.

## 5 Conclusie

In dit onderzoek werd uit een aantal verschillende vaginale *Candida*-isolaten enkele stammen gekozen die maximale infectiviteit vertonen. Ze werden getest op drie belangrijke virulentiefactoren: groei in de vaginale niche, vorming van filamentatie en adhesie aan menselijke HeLa cellen. De stammen die de factoren het best naar boven brengen, zijn het meest virulent. Dit is op de eerste plaats de stam CDAL44, deze scoorde goed op alle drie testen. Hiernaast zijn ook de stammen JS20, JS1 en Ca27A, die goed scoorde op twee van de drie testen, virulente *Candida*-stammen.

Verder werd een probioticum, bakkergist of *S. cerevisiae*, getest op anti-*Candida*-eigenschappen. Een selectie van giststammen, met verschillende oorsprong, werd samen met een *Candida*-stam getest op dezelfde drie virulentiefactoren. De giststam die de factoren het meest onderdrukt, is de stam die veelbelovend is voor het bestrijden van VVC. Er is geen enkele stam die op alle drie testen goed scoort. Wel zijn de stammen SBERH6, 6886 en 6883 het meest belovend.

Deze resultaten geven een mogelijkheid tot verder *in vivo* onderzoek. Hierbij kan men opteren om een sterk virulente *Candida*-stam in te brengen in de vaginale holte van muizen en deze te behandelen met een veelbelovend probioticum. Lijken de testen positief, dan kan men stellen dat dit probioticum ook bestand is tegen minder virulente *Candida*-stammen. Hiernaast kan met ook het effect nagaan van het probioticum in combinatie met medicatie tegen vaginale schimmelinfecties.

## Referentielijst

1. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(6):905–27.
2. Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2015;122(6):785–94.
3. Makanjuola O, Bongomin F, Fayemiwo SA. An update on the roles of non-*albicans candida* species in vulvovaginitis. *J Fungi*. 2018;4(4).
4. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119–28.
5. Kotthoff-Burrell E, Fahy B, Lareau S, Hage C, Sockrider M. Candidemia (blood infection) and other *Candida* infections. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(5).
6. McManus BA, Coleman DC. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014;21:166–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.008>
7. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):80–96.
8. Galocha M, Pais P, Cavalheiro M, Pereira D, Viana R, Teixeira MC. Divergent approaches to virulence in *C. Albicans* and *C. Glabrata*: Two sides of the same coin. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
9. Scorzoni L, de Paula e Silva ACA, Marcos CM, Assato PA, de Melo WCMA, de Oliveira HC, et al. Antifungal therapy: New advances in the understanding and treatment of mycosis. *Front Microbiol*. 2017;8(JAN):1–23.
10. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4):501–17.
11. Kullberg BJ, Viscoli C, Pappas PG, Vazquez J, Ostrosky-Zeichner L, Rotstein C, et al. Isavuconazole Versus Caspofungin in the Treatment of Candidemia and Other Invasive *Candida* Infections: The ACTIVE Trial. *Clin Infect Dis*. 2019;68(12):1981–9.
12. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis*. 2016;74(4):ftw018.
13. Nr L. *Het Antibiogram*. 2005;82(82).
14. Lourenço A, Pedro NA, Salazar SB, Mira NP. Effect of acetic acid and lactic acid at low pH in growth and azole resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Front Microbiol*. 2019;10(JAN):1–11.
15. Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: A review. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(2):266–72.
16. Pericolini E, Gabrielli E, Ballet N, Sabbatini S, Roselletti E, Cayzeele Decherf A, et al. Therapeutic activity of a *Saccharomyces cerevisiae*-based probiotic and inactivated whole yeast on vaginal candidiasis. *Virulence*. 2017;8(1):74–90.
17. Merck KGaA. RPMI-1640 Media [Internet]. 2020. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/rpmi-media.html>
18. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol*. 2001;39(10):3617–22.
19. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012;(62):1–5.
20. Thermo Fisher Scientific. GeneRuler 1 kb DNA Ladder [Internet]. Available from:

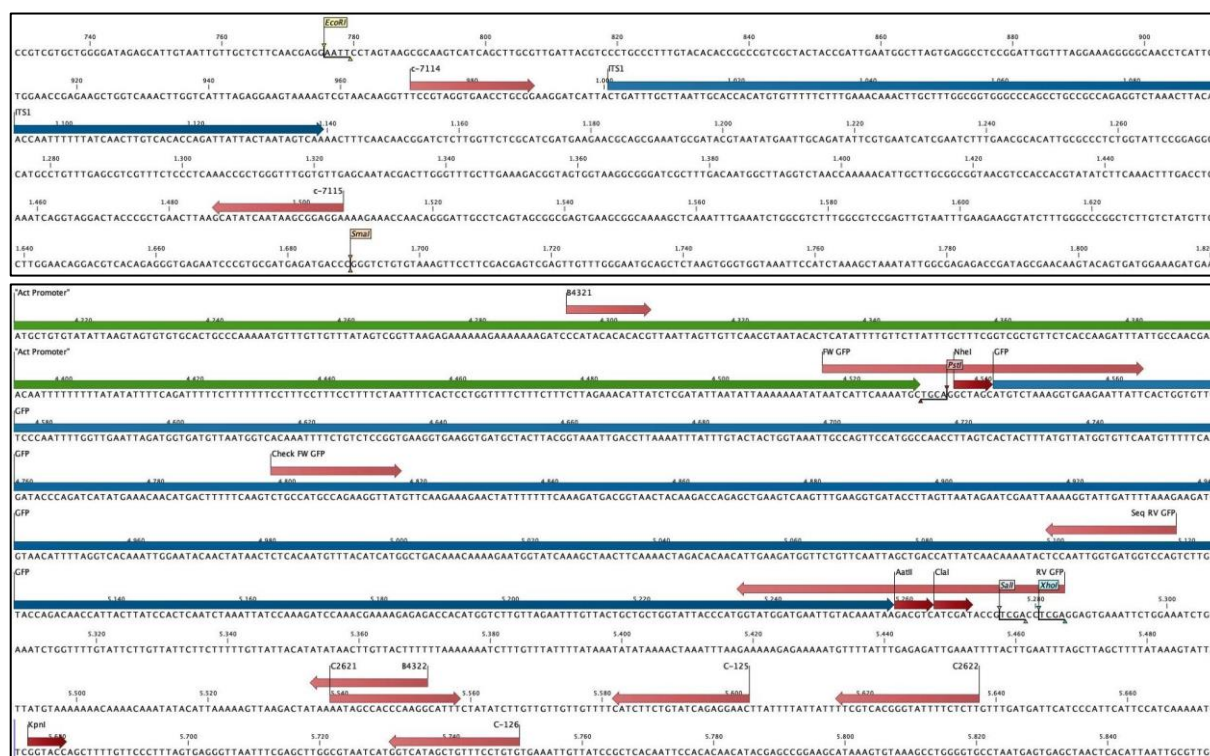
- [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fmanuals%2FMAN0013004\\_GeneRuler\\_1kb\\_DNALadder\\_250ug\\_UG.pdf&title=VXNciBHdWlkZTogR2VuZVJ1bGVyIDEga2IgaRE5BIExhZGRlcg](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fmanuals%2FMAN0013004_GeneRuler_1kb_DNALadder_250ug_UG.pdf&title=VXNciBHdWlkZTogR2VuZVJ1bGVyIDEga2IgaRE5BIExhZGRlcg)
21. Luminex corporation. Guava easyCyte Flow Cytometers [Internet]. 2020. Available from: <https://www.luminexcorp.com/guava-easycyte-flow-cytometers/#overview>



# Bijlagen

Tabel 17: Overzicht gebruikte primers.

Primer	Primersequentie 5'→3'
C-7114	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
C-7115	5'-AGGAGGCGAATAACTATACG-3'
FW GFP	5'-AATCATTCAAAATGCTGCAGGCTAG CATGTCTAAAGGTGAAGAATTATT-3'
Check FW GFP	5'-CTGCCATGCCAGAAGGTTAT-3'
Seq RV GFP	5'-GACCTGGTAGTGGTTAACCT-3'
RV GFP	5'-AGCTCCAGCTGCCATAGCTACTGCA GAATAAACATGTTAAGTAGGTATGG-3'
C-126	5'-GTGTCCTTTGTCGATACTTGG-3'



Figuur 25: Primersequenties *Candida* (boven) en CIP10-GFP (onder).

Tabel 18: *S. cerevisiae* collectie.

	Naam	Oorsprong		Naam	Oorsprong
1	S288c	Lab strain	36	3512	Sputum
2	I-3856 (cerevisia)	Lesaffre	37	3529	Sputum
3	REP	Repoflor®	38	2776	Vaginaal
4	ENT	Enterol®	39	2777	Vaginaal
5	SAN	Boulardi-Sanifort®	40	2780	Vaginaal

	<b>Naam</b>	<b>Oorsprong</b>		<b>Naam</b>	<b>Oorsprong</b>
<b>6</b>	7103	Ultra-Levure batch 7103	<b>41</b>	2966	Fecaal
<b>7</b>	259	Precosa® batch 259	<b>42</b>	2964	Fecaal
<b>8</b>	7136	Ultra-Levure batch 7136	<b>43</b>	3027	Fecaal
<b>9</b>	7135	Ultra-Levure batch 7135	<b>44</b>	3026	Keel
<b>10</b>	FLO	Floratil®	<b>45</b>	3029	Fecaal
<b>11</b>	UL	Onbekend	<b>46</b>	3458	Vaginaal
<b>12</b>	Sb.P	Onbekend	<b>47</b>	3338	Vaginaal
<b>13</b>	Sb.L	Onbekend	<b>48</b>	3471	Vaginaal
<b>14</b>	Sb.A	Onbekend	<b>49</b>	3472	Vaginaal
<b>15</b>	LSB	Levucell®	<b>50</b>	3038	Fecaal
<b>16</b>	SBP modified	SbP SDH1_S288c	<b>51</b>	3076	Serum
<b>17</b>	PV BENJ 2	SbP WHI2_S288c	<b>52</b>	Y.00034	Onbekend
<b>18</b>	259 evolved	whi2 <sup>S287*</sup> /whi2 <sup>S287*</sup>	<b>53</b>	Y.00240	Onbekend
<b>19</b>	SBERH6	SBP - ER	<b>54</b>	4542	Fermentatie vloeistof
<b>20</b>	4609	DNA hybridiz	<b>55</b>	1013	Druiven
<b>21</b>	6883	Onbekend	<b>56</b>	2080	Cru of cognac
<b>22</b>	6884	Onbekend	<b>57</b>	1185	Ale
<b>23</b>	6885	Onbekend	<b>58</b>	KVL 013	Brouwersgist
<b>24</b>	6886	Onbekend	<b>59</b>	CBS 1236	Bakkersgist
<b>25</b>	6887	Onbekend	<b>60</b>	56	Deense blauwe kaas
<b>26</b>	6888	Onbekend	<b>61</b>	D7	Gorgonzola, Italië
<b>27</b>	6889	Onbekend	<b>62</b>	H 78	Kaas, Europa
<b>28</b>	6890	Onbekend	<b>63</b>	H 97	Onbekend
<b>29</b>	6891	Onbekend	<b>64</b>	A6	Sorghum bier, Ghana
<b>30</b>	6892	Onbekend	<b>65</b>	C1	Sorghum bier, Burkina Faso
<b>31</b>	6893	Onbekend	<b>66</b>	149	Spontaan gefermenteerd
<b>32</b>	6894	Onbekend	<b>67</b>	38	Mais deeg
<b>33</b>	6895	Onbekend	<b>68</b>	SR 82	Spontaan gefermenteerd
<b>34</b>	3514	Fecaal	<b>69</b>	SR 41	Koemelk, Sudan
<b>35</b>	3500	Fecaal			

Tabel 19: OD-waarden reeks 1 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in VSM.

	<b>0 uur</b>	<b>4 uur</b>	<b>6 uur</b>	<b>8 uur</b>	<b>24 uur</b>	<b>48 uur</b>
<b>CDAL41</b>	0,100	0,370	0,939	3,045	7,000	7,400
<b>CDAL42</b>	0,100	0,440	1,218	3,025	6,940	8,440
<b>CDAL43</b>	0,100	0,367	0,943	1,295	7,440	11,780
<b>CDAL44</b>	0,100	0,169	0,412	0,790	6,033	8,332
<b>CDAL45</b>	0,100	0,371	1,113	2,695	7,140	4,200
<b>CDAL46</b>	0,100	0,516	1,123	3,465	8,060	11,700
<b>CDAL47</b>	0,100	0,459	1,526	3,945	8,420	10,140

	<b>0 uur</b>	<b>4 uur</b>	<b>6 uur</b>	<b>8 uur</b>	<b>24 uur</b>	<b>48 uur</b>
<b>CDAL48</b>	0,100	0,390	0,956	3,195	7,560	8,960
<b>CDAL49</b>	0,100	0,390	1,177	3,165	7,640	10,900
<b>CDGL26</b>	0,100	0,488	1,501	3,965	8,66	11,360
<b>Ca3153</b>	0,100	0,366	0,926	3,005	8,78	6,020
<b>BG2</b>	0,100	0,421	1,077	3,685	8,000	10,300

Tabel 20: OD-waarden reeks 1 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in RPMI.

	<b>0 uur</b>	<b>4 uur</b>	<b>6 uur</b>	<b>8 uur</b>	<b>24 uur</b>	<b>48 uur</b>
<b>CDAL41</b>	0,100	0,174	1,150	3,545	7,360	7,140
<b>CDAL42</b>	0,100	0,336	1,202	3,565	8,340	8,000
<b>CDAL43</b>	0,100	0,280	0,844	2,325	5,840	6,320
<b>CDAL44</b>	0,100	0,349	0,452	1,341	5,660	5,906
<b>CDAL45</b>	0,100	0,349	1,174	2,590	4,600	4,000
<b>CDAL46</b>	0,100	0,423	1,373	3,505	7,620	7,820
<b>CDAL47</b>	0,100	0,467	1,325	2,420	3,990	3,790
<b>CDAL48</b>	0,100	0,353	0,977	1,570	4,700	4,660
<b>CDAL49</b>	0,100	0,319	1,041	1,935	4,050	3,420
<b>CDGL26</b>	0,100	0,612	2,124	3,600	5,680	6,040
<b>Ca3153</b>	0,100	0,572	1,773	3,685	7,620	7,820
<b>BG2</b>	0,100	0,399	1,288	2,065	4,150	4,900

Tabel 21: OD-waarden reeks 2 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in VSM.

	<b>0 uur</b>	<b>4 uur</b>	<b>6 uur</b>	<b>8 uur</b>	<b>24 uur</b>	<b>48 uur</b>
<b>JS1</b>	0,100	0,343	1,027	2,627	13,332	12,760
<b>JS3</b>	0,100	0,390	1,076	2,680	11,759	10,54
<b>JS7</b>	0,100	0,048	0,119	0,836	7,209	6,909
<b>JS14</b>	0,100	0,333	0,981	2,699	9,793	10,512
<b>JS15</b>	0,100	0,267	0,808	1,948	9,463	11,912
<b>JS16</b>	0,100	0,155	0,739	2,065	9,855	6,872
<b>JS19</b>	0,100	0,201	0,757	2,053	6,825	10,127
<b>JS20</b>	0,100	0,291	0,928	2,547	7,916	13,645
<b>JS27</b>	0,100	0,367	1,069	2,981	11,101	10,634

Tabel 22: OD-waarden reeks 2 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in RPMI.

	<b>0 uur</b>	<b>4 uur</b>	<b>6 uur</b>	<b>8 uur</b>	<b>24 uur</b>	<b>48 uur</b>
<b>JS1</b>	0,100	0,465	0,973	1,848	5,146	4,740
<b>JS3</b>	0,100	0,458	0,965	1,347	4,779	4n855
<b>JS7</b>	0,100	0,219	0,783	0,880	1,191	0,409
<b>JS14</b>	0,100	0,355	1,082	1,776	3,238	3,953
<b>JS15</b>	0,100	0,235	0,871	1,462	3,934	3,711
<b>JS16</b>	0,100	0,200	0,588	1,020	2,204	2,390
<b>JS19</b>	0,100	0,304	0,747	1,006	2,998	3,288

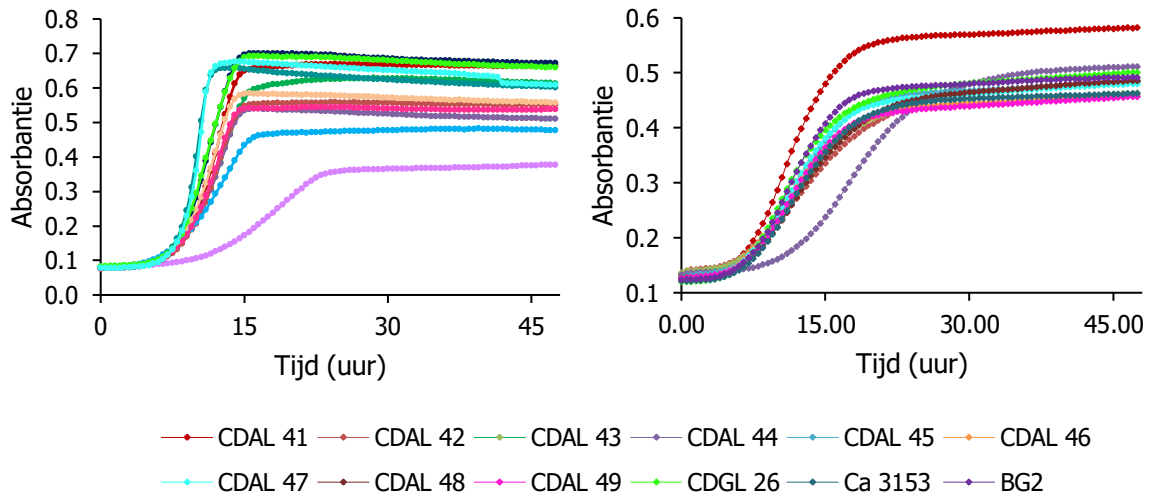
	<b>0 uur</b>	<b>4 uur</b>	<b>6 uur</b>	<b>8 uur</b>	<b>24 uur</b>	<b>48 uur</b>
<b>JS20</b>	0,100	0,273	1,133	1,669	2,590	2,957
<b>JS27</b>	0,100	0,460	1,026	1,561	4,619	4,88

Tabel 23: OD-waarden reeks 3 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in VSM.

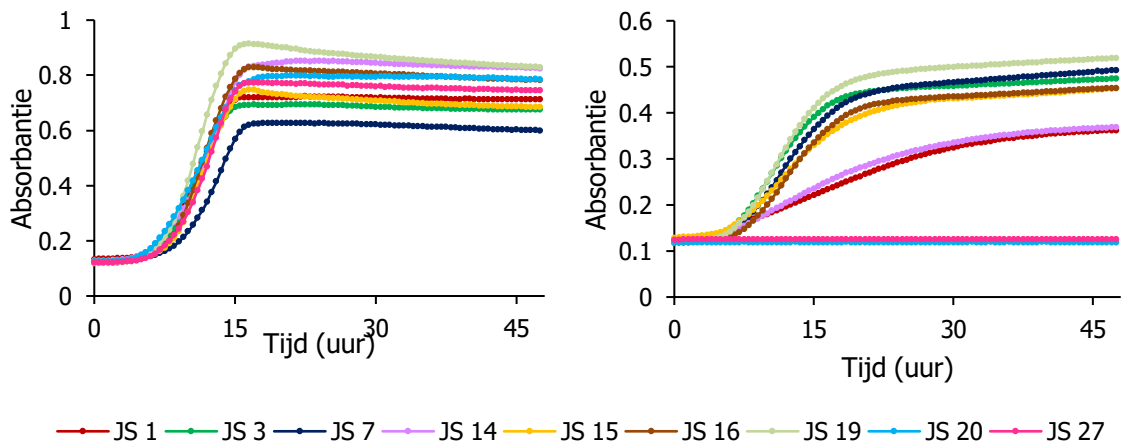
	<b>0 uur</b>	<b>4 uur</b>	<b>6 uur</b>	<b>8 uur</b>	<b>24 uur</b>	<b>48 uur</b>
<b>Ca2A</b>	0,100	0,037	0,180	1,042	8,164	8,636
<b>Ca8A</b>	0,100	0,021	0,104	0,705	6,682	8,369
<b>Ca10A</b>	0,100	0,129	0,494	1,704	8,349	8,759
<b>Ca11A</b>	0,100	0,128	0,159	0,650	6,420	6,952
<b>Ca14A</b>	0,100	0,141	0,280	1,065	4,368	10,51
<b>Ca15A</b>	0,100	0,035	0,121	0,685	3,062	6,905
<b>Ca16A</b>	0,100	0,049	0,063	0,933	4,991	7,655
<b>Ca18A</b>	0,100	0,137	0,237	0,912	8,577	10,505
<b>Ca19A</b>	0,100	0,046	0,134	0,758	8,339	5,231
<b>Ca20A</b>	0,100	0,041	0,091	1,062	3,405	5,557
<b>Ca22A</b>	0,100	0,078	0,205	0,495	2,581	7,381
<b>Ca23A</b>	0,100	0,114	0,209	1,071	10,765	8,721
<b>Ca26A</b>	0,100	0,028	0,243	0,995	10,974	8,098
<b>Ca27A</b>	0,100	0,196	0,487	1,159	7,824	11,040
<b>Ca28A</b>	0,100	0,022	0,162	0,747	8,220	8,355
<b>Ca3153</b>	0,100	0,308	0,826	1,756	8,693	9,851

Tabel 24: OD-waarden reeks 3 na 0,4,6,8,24 en 48 uur groei in RPMI.

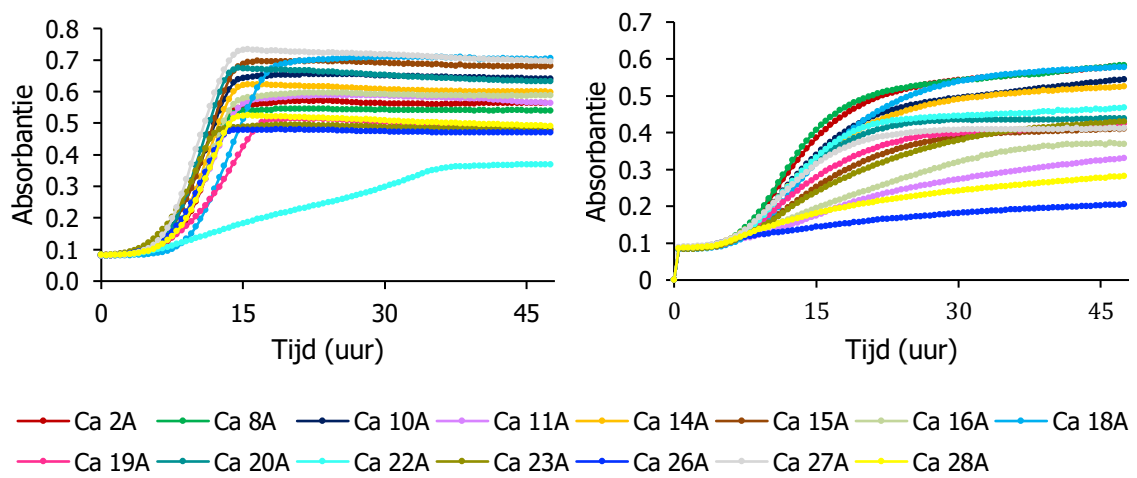
	<b>0 uur</b>	<b>4 uur</b>	<b>6 uur</b>	<b>8 uur</b>	<b>24 uur</b>	<b>48 uur</b>
<b>Ca2A</b>	0,100	0,146	0,267	1,732	5,219	5,827
<b>Ca8A</b>	0,100	0,174	0,330	2,301	5,866	5,284
<b>Ca10A</b>	0,100	0,139	0,215	1,341	5,197	5,465
<b>Ca11A</b>	0,100	0,189	0,149	0,664	2,522	3,028
<b>Ca14A</b>	0,100	0,193	0,243	1,395	4,711	5,393
<b>Ca15A</b>	0,100	0,051	0,263	0,691	3,869	5,017
<b>Ca16A</b>	0,100	0,176	0,310	1,721	4,559	4,116
<b>Ca18A</b>	0,100	0,202	0,295	1,863	6,901	6,868
<b>Ca19A</b>	0,100	0,202	0,306	1,323	4,301	3,354
<b>Ca20A</b>	0,100	0,203	0,433	1,730	5,646	5,694
<b>Ca22A</b>	0,100	0,190	0,344	1,813	5,791	5,960
<b>Ca23A</b>	0,100	0,167	0,324	1,918	5,659	5,274
<b>Ca26A</b>	0,100	0,205	0,237	0,878	2,143	1,556
<b>Ca27A</b>	0,100	0,197	0,305	1,301	3,873	4,378
<b>Ca28A</b>	0,100	0,138	0,282	1,960	5,722	4,530
<b>Ca3153</b>	0,100	0,266	0,463	1,667	4,052	5,995



Figuur 26: Resultaten groei Multiskan reeks 1.



Figuur 27: Resultaten groei Multiskan reeks 2.



Figuur 28: Resultaten groei Multiskan reeks 3.

Tabel 25: Resultaten adhesie reeks 1.

	Hoeveelheid geadheerd (# kolonies/plaat)	Hoeveelheid geadheerd (Cellen/ml)	Hoeveelheid toegevoegd (# kolonies/plaat)	Hoeveelheid toegevoegd (Cellen/ml)	Hoeveelheid geadheerd (%)
<b>CDAL41</b>	415	415000	246	24600000	1,69
<b>CDAL42</b>	439	439000	248	24800000	1,77
<b>CDAL43</b>	390	390000	180	18000000	2,17
<b>CDAL44</b>	520	520000	158	15800000	3,29
<b>CDAL45</b>	331	331000	122	12200000	2,71
<b>CDAL46</b>	339	339000	149	14900000	2,28
<b>CDAL47</b>	444	444000	125	12500000	3,55
<b>CDAL48</b>	443	443000	189	18900000	2,34
<b>CDAL49</b>	254	254000	196	19600000	1,30
<b>CDAL26</b>	679	679000	486	48600000	1,40
<b>Ca3153</b>	474	474000	168	16800000	2,82
<b>BG2</b>	+1000	+1000000	319	31900000	+3,14

Tabel 26: Resultaten adhesie reeks 2.

	Hoeveelheid geadheerd (# kolonies/plaat)	Hoeveelheid geadheerd (Cellen/ml)	Hoeveelheid toegevoegd (# kolonies/plaat)	Hoeveelheid toegevoegd (Cellen/ml)	Hoeveelheid geadheerd (%)
<b>JS1</b>	191	191000	223	22300000	0,86
<b>JS3</b>	120	120000	238	23800000	0,50
<b>JS7</b>	71	71000	211	21100000	0,34
<b>JS14</b>	115	115000	294	29400000	0,39
<b>JS15</b>	93	93000	299	29900000	0,31
<b>JS16</b>	149	149000	208	20800000	0,72
<b>JS19</b>	119	119000	112	11200000	1,06
<b>JS20</b>	40	40000	198	19800000	0,20
<b>JS27</b>	160	160000	201	20100000	0,80

Tabel 27: Resultaten adhesie reeks 3.

	Hoeveelheid geadheerd (# kolonies/plaat)	Hoeveelheid geadheerd (Cellen/ml)	Hoeveelheid toegevoegd (# kolonies/plaat)	Hoeveelheid toegevoegd (Cellen/ml)	Hoeveelheid geadheerd (%)
<b>Ca2A</b>	170	170000	226	22600000	0,75
<b>Ca8A</b>	130	130000	171	17100000	0,76
<b>Ca10A</b>	118	118000	220	22000000	0,54
<b>Ca11A</b>	152	152000	178	17800000	0,85
<b>Ca14A</b>	267	267000	195	19500000	1,37
<b>Ca15A</b>	149	149000	221	22100000	0,67
<b>Ca16A</b>	244	244000	151	15100000	1,62
<b>Ca18A</b>	197	197000	313	31300000	0,63

	Hoeveelheid geadheid (# kolonies/plaat)	Hoeveelheid geadheid (Cellen/ml)	Hoeveelheid toegevoegd (# kolonies/plaat)	Hoeveelheid toegevoegd (Cellen/ml)	Hoeveelheid geadheid (%)
<b>Ca19A</b>	185	185000	251	25100000	0,74
<b>Ca20A</b>	337	337000	328	32800000	1,03
<b>Ca22A</b>	255	255000	199	19900000	1,28
<b>Ca23A</b>	252	252000	287	28700000	0,88
<b>Ca26A</b>	124	124000	251	25100000	0,49
<b>Ca27A</b>	90	90000	235	23500000	0,38
<b>Ca28A</b>	113	113000	249	24900000	0,45

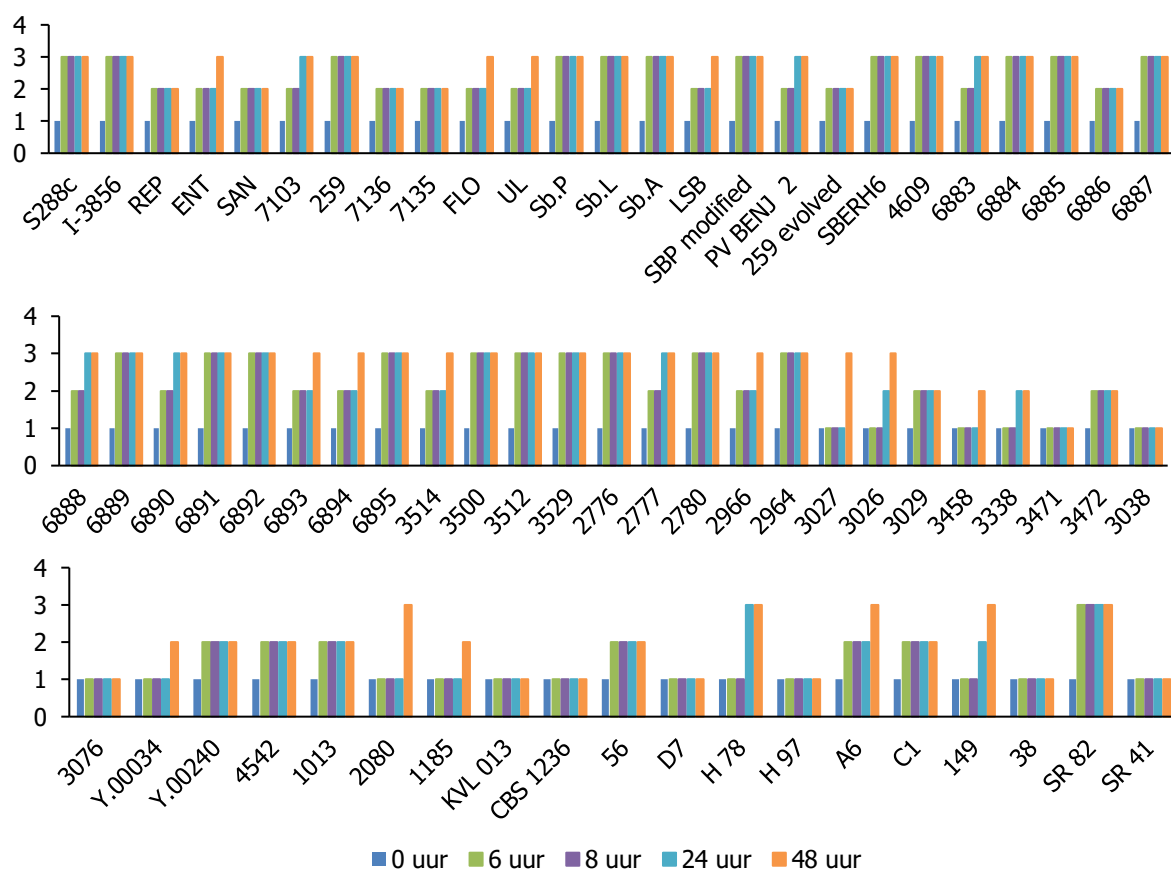
Tabel 28: Resultaten groei in aanwezigheid van *S. cerevisiae*.

	0 uur			24 uur VSM			24 uur RPMI		
	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)
<b>S288c</b>	75	25	0,33	83,89	16,06	0,19	87,62	12,14	0,14
<b>I-3856 (cerevisia)</b>	75	25	0,33	46,87	53,03	1,13	46,24	53,52	1,16
<b>REP</b>	75	25	0,33	0,21	99,76	466,97	84,45	12,61	0,15
<b>ENT</b>	75	25	0,33	39,32	60,59	1,54	76,20	23,68	0,31
<b>SAN</b>	75	25	0,33	27,68	72,18	2,61	71,18	28,66	0,40
<b>7103</b>	75	25	0,33	34,15	65,64	1,92	58,03	41,81	0,72
<b>259</b>	75	25	0,33	35,73	64,06	1,79	27,11	72,75	2,68
<b>7136</b>	75	25	0,33	31,28	68,64	2,19	67,64	32,17	0,48
<b>7135</b>	75	25	0,33	27,92	71,38	2,56	56,58	43,30	0,77
<b>FLO</b>	75	25	0,33	39,66	59,96	1,51	69,10	30,85	0,45
<b>UL</b>	75	25	0,33	32,48	67,37	2,07	77,50	22,28	0,29
<b>Sb.P</b>	75	25	0,33	52,19	47,58	0,91	83,06	16,94	0,20
<b>Sb.L</b>	75	25	0,33	37,73	62,17	1,65	52,32	47,56	0,91
<b>Sb.A</b>	75	25	0,33	32,22	67,64	2,10	48,42	51,33	1,06
<b>LSB</b>	75	25	0,33	32,02	67,85	2,12	45,84	54,13	1,18
<b>SBP modified</b>	75	25	0,33	57,58	42,26	0,73	49,63	50,26	1,01
<b>PV BENJ 2</b>	75	25	0,33	33,13	66,72	2,01	37,69	62,27	1,65
<b>259 evolved</b>	75	25	0,33	46,22	53,66	1,16	62,78	37,17	0,59
<b>SBERH6</b>	75	25	0,33	77,73	21,99	0,28	75,19	24,54	0,33
<b>4609</b>	75	25	0,33	34,28	65,59	1,91	50,42	49,53	0,98
<b>6883</b>	75	25	0,33	60,33	39,58	0,66	28,06	71,84	2,56
<b>6884</b>	75	25	0,33	35,35	64,42	1,82	39,91	59,80	1,50
<b>6885</b>	75	25	0,33	41,19	58,43	1,42	39,12	60,71	1,55
<b>6886</b>	75	25	0,33	53,83	46,07	0,86	73,67	26,25	0,36
<b>6887</b>	75	25	0,33	48,95	48,51	0,99	44,71	54,86	1,23
<b>6888</b>	75	25	0,33	17,50	82,30	4,70	42,65	56,98	1,34

	0 uur			24 uur VSM			24 uur RPMI		
	Sc (%)	Ca (%)	Ca/Sc (%)	Sc (%)	Ca (%)	Ca/Sc (%)	Sc (%)	Ca (%)	Ca/Sc (%)
<b>6889</b>	75	25	0,33	7,83	91,66	11,70	39,62	60,17	1,52
<b>6890</b>	75	25	0,33	50,87	48,82	0,96	52,27	47,44	0,91
<b>6891</b>	75	25	0,33	28,04	71,90	2,56	43,49	56,18	1,29
<b>6892</b>	75	25	0,33	5,52	94,37	17,10	63,75	35,34	0,55
<b>6893</b>	75	25	0,33	20,16	78,79	3,91	80,76	18,61	0,23
<b>6894</b>	75	25	0,33	43,13	56,12	1,30	63,44	36,35	0,57
<b>6895</b>	75	25	0,33	22,78	76,32	3,35	51,96	47,45	0,91
<b>3514</b>	75	25	0,33	31,34	68,45	2,18	80,12	19,72	0,25
<b>3500</b>	75	25	0,33	36,42	63,34	1,74	73,87	26,04	0,35
<b>3512</b>	75	25	0,33	57,18	42,22	0,74	63,50	36,18	0,57
<b>3529</b>	75	25	0,33	39,85	59,91	1,50	61,07	38,52	0,63
<b>2776</b>	75	25	0,33	10,11	89,41	8,84	43,79	55,84	1,28
<b>2777</b>	75	25	0,33	33,37	66,20	1,98	59,33	40,31	0,68
<b>2780</b>	75	25	0,33	26,73	73,03	2,73	50,88	48,74	0,96
<b>2966</b>	75	25	0,33	50,90	48,78	0,96	81,05	18,75	0,23
<b>2964</b>	75	25	0,33	12,87	86,68	6,74	89,97	9,91	0,11
<b>3027</b>	75	25	0,33	37,97	61,76	1,63	58,32	41,53	0,71
<b>3026</b>	75	25	0,33	21,50	78,10	3,63	73,42	26,47	0,36
<b>3029</b>	75	25	0,33	16,68	82,92	4,97	85,44	14,39	0,17
<b>3458</b>	75	25	0,33	25,25	74,24	2,94	82,20	17,67	0,22
<b>3338</b>	75	25	0,33	14,68	85,20	5,80	13,50	86,39	6,40
<b>3471</b>	75	25	0,33	44,87	54,62	1,22	78,33	21,23	0,27
<b>3472</b>	75	25	0,33	32,14	67,57	2,10	83,15	16,70	0,20
<b>3038</b>	75	25	0,33	3,15	96,45	30,61	30,10	69,45	2,31
<b>3076</b>	75	25	0,33	23,83	75,86	3,18	43,49	56,18	1,29
<b>Y.00034</b>	75	25	0,33	9,76	90,04	9,22	79,81	20,04	0,25
<b>Y.00240</b>	75	25	0,33	19,42	80,37	4,14	55,75	40,90	0,73
<b>4542</b>	75	25	0,33	58,94	40,87	0,69	81,85	18,05	0,22
<b>1013</b>	75	25	0,33	12,03	87,50	7,27	87,53	12,29	0,14
<b>2080</b>	75	25	0,33	17,31	82,07	4,74	51,96	47,77	0,92
<b>1185</b>	75	25	0,33	1,57	98,23	62,66	3,78	96,10	25,43
<b>KVL 013</b>	75	25	0,33	0,86	98,96	115,07	83,17	15,68	0,19
<b>CBS 1236</b>	75	25	0,33	42,20	57,59	1,36	90,40	9,52	0,11
<b>56</b>	75	25	0,33	11,20	88,71	7,92	47,03	52,87	1,12
<b>D7</b>	75	25	0,33	38,95	60,87	1,56	92,01	7,88	0,09
<b>H 78</b>	75	25	0,33	26,29	73,57	2,80	61,58	38,15	0,62
<b>H 97</b>	75	25	0,33	28,41	71,41	2,51	40,89	58,90	1,44
<b>A6</b>	75	25	0,33	11,14	88,77	7,97	12,96	86,82	6,70
<b>C1</b>	75	25	0,33	1,58	98,31	62,04	7,20	92,69	12,88
<b>149</b>	75	25	0,33	17,26	82,57	4,78	25,95	73,88	2,85



	0 uur			24 uur VSM			24 uur RPMI		
	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)
<b>38</b>	75	25	0,33	46,97	52,94	1,13	77,48	22,32	0,29
<b>SR 82</b>	75	25	0,33	16,56	83,36	5,03	62,54	37,08	0,59
<b>SR 41</b>	75	25	0,33	12,10	87,74	7,25	43,21	56,51	1,31



Figuur 29: Resultaten filamentatie in aanwezigheid van *S. cerevisiae*.

Tabel 29: Resultaten adhesie in aanwezigheid van *S. cerevisiae*.

	0 uur			24 uur VSM		
	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)
<b>S288c</b>	75	25	0,33	71,31	28,69	0,40
<b>I-3856 (cerevisia)</b>	75	25	0,33	46,98	53,02	1,13
<b>REP</b>	75	25	0,33	70,73	28,91	0,41
<b>ENT</b>	75	25	0,33	63,53	36,47	0,57
<b>SAN</b>	75	25	0,33	74,67	25,29	0,34
<b>7103</b>	75	25	0,33	74,65	25,28	0,34
<b>259</b>	75	25	0,33	67,47	32,53	0,48

	0 uur			24 uur VSM		
	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)
<b>7136</b>	75	25	0,33	67,65	32,31	0,48
<b>7135</b>	75	25	0,33	51,77	48,17	0,93
<b>FLO</b>	75	25	0,33	77,32	22,59	0,29
<b>UL</b>	75	25	0,33	67,05	32,89	0,49
<b>Sb.P</b>	75	25	0,33	69,77	30,20	0,43
<b>Sb.L</b>	75	25	0,33	73,73	26,23	0,36
<b>Sb.A</b>	75	25	0,33	77,07	22,80	0,30
<b>LSB</b>	75	25	0,33	55,93	44,01	0,79
<b>SBP</b>	75	25	0,33	77,28	22,72	0,29
<b>modified</b>						
<b>PV BENJ 2</b>	75	25	0,33	71,72	28,28	0,39
<b>259 evolved</b>	75	25	0,33	83,76	16,21	0,19
<b>SBERH6</b>	75	25	0,33	89,61	10,39	0,12
<b>4609</b>	75	25	0,33	94,46	5,54	0,06
<b>6883</b>	75	25	0,33	84,43	15,57	0,18
<b>6884</b>	75	25	0,33	66,51	33,49	0,50
<b>6885</b>	75	25	0,33	65,81	34,19	0,52
<b>6886</b>	75	25	0,33	85,73	14,27	0,17
<b>6887</b>	75	25	0,33	82,01	17,99	0,22
<b>6888</b>	75	25	0,33	92,39	7,56	0,08
<b>6889</b>	75	25	0,33	67,55	32,45	0,48
<b>6890</b>	75	25	0,33	81,66	18,34	0,22
<b>6891</b>	75	25	0,33	91,81	8,19	0,09
<b>6892</b>	75	25	0,33	58,42	41,58	0,71
<b>6893</b>	75	25	0,33	84,19	15,72	0,19
<b>6894</b>	75	25	0,33	74,00	25,89	0,35
<b>6895</b>	75	25	0,33	69,12	30,56	0,44
<b>3514</b>	75	25	0,33	64,50	35,37	0,55
<b>3500</b>	75	25	0,33	70,89	28,76	0,41
<b>3512</b>	75	25	0,33	70,70	28,82	0,41
<b>3529</b>	75	25	0,33	48,79	51,21	1,05
<b>2776</b>	75	25	0,33	57,52	42,36	0,74
<b>2777</b>	75	25	0,33	52,32	47,68	0,91
<b>2780</b>	75	25	0,33	49,88	50,04	1,00
<b>2966</b>	75	25	0,33	57,94	41,93	0,72
<b>2964</b>	75	25	0,33	86,08	13,45	0,16
<b>3027</b>	75	25	0,33	82,12	17,39	0,21
<b>3026</b>	75	25	0,33	49,26	50,67	1,03
<b>3029</b>	75	25	0,33	42,72	56,89	1,33
<b>3458</b>	75	25	0,33	86,79	12,82	0,15

	0 uur			24 uur VSM		
	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)	<i>Sc</i> (%)	<i>Ca</i> (%)	<i>Ca/Sc</i> (%)
<b>3338</b>	75	25	0,33	13,69	86,31	6,30
<b>3471</b>	75	25	0,33	79,03	20,77	0,26
<b>3472</b>	75	25	0,33	57,15	41,95	0,73
<b>3038</b>	75	25	0,33	80,16	19,71	0,25
<b>3076</b>	75	25	0,33	82,08	17,58	0,21
<b>Y.00034</b>	75	25	0,33	56,03	43,48	0,78
<b>Y.00240</b>	75	25	0,33	93,08	5,65	0,06
<b>4542</b>	75	25	0,33	73,84	25,49	0,35
<b>1013</b>	75	25	0,33	87,07	11,89	0,14
<b>2080</b>	75	25	0,33	39,61	60,00	1,51
<b>1185</b>	75	25	0,33	13,43	86,16	6,42
<b>KVL 013</b>	75	25	0,33	50,49	48,87	0,97
<b>CBS 1236</b>	75	25	0,33	28,81	71,07	2,47
<b>56</b>	75	25	0,33	3,56	96,30	27,09
<b>D7</b>	75	25	0,33	28,28	71,32	2,52
<b>H 78</b>	75	25	0,33	17,23	82,62	4,79
<b>H 97</b>	75	25	0,33	36,39	63,32	1,74
<b>A6</b>	75	25	0,33	28,90	70,98	2,46
<b>C1</b>	75	25	0,33	69,91	29,33	0,42
<b>149</b>	75	25	0,33	69,25	29,62	0,43
<b>38</b>	75	25	0,33	81,86	17,56	0,21
<b>SR 82</b>	75	25	0,33	77,02	21,19	0,28
<b>SR 41</b>	75	25	0,33	81,99	17,39	0,21