



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Waarom langdradige schimmels niet saai zijn

Ram, A.F.J.

Citation

Ram, A. F. J. (2024). *Waarom langdradige schimmels niet saai zijn*. Leiden. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3715755>

Version: Publisher's Version

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3715755>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Prof.dr. A.F.J. Ram

Waarom langdradige schimmels niet saai zijn



Universiteit
Leiden

Bij ons leer je de wereld kennen

Waarom langdradige schimmels niet saai zijn

Oratie uitgesproken door

Prof.dr. A.F.J. Ram

bij de aanvaarding van het ambt van hoogleraar

Schimmelgenetica en Biotechnologie

aan de Universiteit Leiden

op vrijdag 9 februari 2024



**Universiteit
Leiden**

Mevrouw de Rector Magnificus, zeer gewaardeerde toehoorders,

De titel van mijn rede luidt: “Waarom langdradige schimmels niet saai zijn”

Introductie

Vanaf de zitbank in onze huiskamer krijg ik vaak vragen van Efe. Efe is zeven jaar, leest heel graag en leest veel en is ook zeer geïnteresseerd in dieren. Freek is één van zijn helden en Efe heeft alle Albert Heijn plaatjes van expeditie oceaans verzameld waar onderwaterdieren en hun specifieke kenmerken worden genoemd. Efe deelt deze informatie heel graag en zo weet ik bijvoorbeeld dat het grootste dier op aarde een blauwe vinvis is. Een volwassen vrouwtje kan wel 30 meter lang worden en tot 200.000 kilo wegen. Dat zijn ongeveer 30 volwassen mannetjes olifanten bij elkaar. Zo weet ik ook dat de tong van blauwe vinvis wel 3000 kilo weegt, ongeveer een halve olifant.

Dat is natuurlijk heel indrukwekkend en minder bekend is wellicht dat er organismen op aarde voorkomen die nog groter zijn. Wist u dat het grootste organisme ooit ontdekt op onze planeet een paddenstoel-vormende schimmel is? Voordat ik hier wat meer over ga vertellen wil ik u graag iets uitleggen over hoe een schimmel groeit en hoe zijn levenscyclus eruit ziet.

Eigenlijk begint de levenscyclus van een schimmel met een schimmelspore. Dit is een soort van zaadje, goed beschermd tegen uitdroging en kan dus wel een stootje hebben. Als deze dormante schimmelspore op een goed plek terecht komt kan die spore gaan ontkiemen en uitgroeien. Deze uitgroei noemen we een kiembuis en die kiembuis kan verder groeien en zich verder vertakken en er worden hyfen gevormd. Deze hyfen zijn de lange schimmeldraden. De meeste schimmels groeien op deze manier en worden filamenteuze schimmels genoemd omdat ze dus als lange filamenten groeien. Zolang er genoeg voedsel voor de schimmel aanwezig is zullen de schimmeldraden

verder groeien en ontstaat er een netwerk van schimmeldraden dat we een mycelium noemen. Vanuit een enkele spore kan zich een heel netwerk van schimmeldraden ontwikkelen. Als we dat in het lab doen kunnen we wat sporen in het midden van een Petrischaal enten en dan vormt zich daar een mooie symmetrisch gevormde kolonie. Als op een gegeven moment de voedingsstoffen in het medium opraken, gaan we naar de volgende stap in de levenscyclus en dat is het vormen van sporen. De schimmel beseft dat er op deze plek geen verdere groei mogelijk is en gaat sporen vormen. Deze sporen verspreiden zich makkelijk bijvoorbeeld via de wind en kunnen dan op andere plekken terecht komen waar ze, onder goede omstandigheden, weer kunnen ontkiemen. De levenscyclus is op deze manier gesloten.

Er zijn heel veel verschillende soorten schimmels en net zoals het dieren- en het plantenrijk worden schimmels onderverdeeld in een aantal groepen op basis van hun overeenkomsten in bijvoorbeeld het DNA van de schimmels. Twee belangrijke groepen van schimmels zijn de paddenstoel-vormende schimmels en de zogenoemde molds. De molds zijn bijvoorbeeld de snelgroeende schimmels die, als we pech hebben, op een sinaasappel zien groeien. Het zijn ook de schimmels die op vochtige plekken in kelders voor overlast kunnen zorgen.

De paddenstoel-vormende schimmels worden, zoals de naam al aangeeft, gekenmerkt door het vermogen om paddenstoelen te vormen. Voor sommige soorten van de paddenstoel-vormende schimmels geldt dat de paddenstoelen gevormd worden aan de rand van de schimmelkolonie. In de natuur kunnen we dit ook waarnemen en we kennen dit als een heksenkring. Zo'n heksenkring is dus het resultaat van een groot ondergronds netwerk van mycelium draden, ooit begonnen waarschijnlijk als een enkele spore die in een cirkel is uitgroeid. Elk jaar, vaak in de herfst, vormt dat ondergrondse mycelium aan de rand van de kolonie paddenstoelen die boven de grond komen en voor ons zichtbaar zijn. Als u gelukt heeft en beetje goed oplet, kunt u de heksenkringen zelf waarnemen in het bos of in een grasveld.

Nog even terug naar de blauwe vinvis van 200.000 kilo en het grootste organisme ter wereld. Aan het eind van de jaren 80 is er een gigantisch schimmelnetwerk ontdekt (1). Onderzoekers konden door middel van DNA onderzoek aantonen dat het hier ging om één enkel individu. Dit enkele individu had zich verspreid over een oppervlakte van bijna 75 hectares (53 voetbalvelden) en heeft een geschat gewicht van tenminste 200.000 kilo. Op basis van de groeisnelheid van deze schimmel hebben de onderzoekers geconcludeerd dat deze schimmelkolonie ongeveer 2500 jaar oud moet zijn. Dus Efe en voor iedereen: het grootste organisme op de wereld is een schimmel!

The Future is Fungi!

Het leven op onze planeet komt steeds verder onder druk te staan. Het almaar groeiend aantal mensen op deze aarde heeft directe consequenties waarbij voedseltekorten en gebrek aan veilige levensomgeving meteen duidelijk zijn. Daarnaast vereist de klimaatverandering, het opraken van fossiele brandstoffen, en verontreinigingen in het milieu door giftige stoffen en plastics een grote inspanning om al deze problemen voor volgende generatie(s) op een duurzame manier op te lossen. In 2015 hebben de Verenigde Naties een agenda voor 2030 opgesteld waarin duurzame ontwikkelingen worden aangegeven om deze problemen in de toekomst te kunnen oplossen. Centraal in deze blauwdruk staan 17 zogenoemde Sustainable Development Goals die een dringende oproep zijn tot actie. In een White paper - een op een toegankelijk manier geschreven artikel voor wetenschappers, politici en ander geïnteresseerden - beschrijven we als groep van 27 schimmel-wetenschappers waar ikzelf ook deel van uitmaak, dat de biotechnologie van filamenteuze schimmels een significantie bijdrage kan leveren om de 10 van deze Sustainable Development Goals te verwezenlijken (2). Ik zal ze niet alle tien gaan bespreken, maar wil er toch een drietal noemen.

Zonder daar nu in heel veel detail op in te gaan, is het goed om te beseffen dat ongeveer 20 tot 25% van ons voedsel niet geconsumeerd wordt omdat het voortijdig door schimmels

wordt aangetast. Dat kan tijdens het kweken gebeuren waarbij plant-pathogene schimmels ervoor zorgen dat planten worden aangetast en de oogst verloren gaat. Gewassen als tomaat en banaan zijn heel gevoelig voor aantasting door schimmels. Bederf kan ook na de oogst optreden en schimmels vormen een grote uitdaging bij het voorkomen van voedselbederf. Onderzoek naar manieren om planten op een duurzame manier resistent te maken tegen schimmels (dus niet via het gebruik van hoge concentraties anti-schimmelstoffen) of onderzoek om de populatie van micro-organisme in de bodem zodanig te controleren dat pathogene schimmels geen kans meer krijgen, zijn voorbeelden van onderzoek om efficiënter en duurzamer voedsel te produceren.

Een ander belangrijk onderzoeksgebied is het afbreken van plastics of andere toxische stoffen zoals medicijnen. Schimmels zijn van nature in staat om complexe verbindingen af te breken die voorkomen in planten. Het gaat in dit geval veelal om fenolische of aromatische verbindingen waar het lignine in de plantencelwand uit is opgebouwd. Het gaat niet alleen over lignine maar ook om andere macromoleculen zoals bijvoorbeeld cutine. Cutine vormt de wasachtige laag op veel bladeren of vruchten die ervoor zorgt dat het blad of de vrucht waterafstotend wordt. Deze moleculen (lignine en cutine) hebben overeenkomsten met sommige plastics en er wordt veel onderzoek gedaan, ook in ons lab, om te onderzoeken of, en welke schimmelenzymen we kunnen gebruiken voor het afbreken of wellicht recyclen van plastics en andere toxische stoffen.

Filamenteuze schimmels worden al lange tijd gebruikt als eiwitfabriek voor de productie van allerlei eiwitten en enzymen. Ik kom daar later in de oratie nog wat uitgebreider op terug. Relatief nieuw is het onderzoek om schimmels dierlijke eiwitten te laten produceren als een alternatief voor dierlijk geproduceerde eiwitten. De CO₂- en de water footprint, dat wil zeggen de hoeveelheid CO₂ geproduceerd per kg eiwit, of de hoeveelheid water die nodig is voor de productie van 1 kg eiwit met schimmels is veel lager ten opzichte van eiwitten

verkregen uit dierlijke cellen of dierlijke producten. U moet op dit moment bijvoorbeeld denken aan ovalbumine productie (het meest voorkomend eiwit in eieren) en caseïnes (de meest voorkomende eiwitten in kaas). Veel onderzoeksgroepen en startende bedrijven doen op dit moment onderzoek om op een efficiënte manier dit soort eiwitten met behulp van schimmels of andere micro-organismen te produceren om zo een duurzaam alternatief te hebben voor dierlijk geproduceerde eiwitten. In mijn groep wordt op dit moment hard gewerkt om, in samenwerking met het bedrijf Those Vegan Cowboys, de productie van met name kaaseiwitten in *Aspergillus* te verbeteren, waarbij het uiteindelijk de bedoeling is om via deze door een schimmel geproduceerde caseïnes kaas te kunnen maken.

Hoe komen schimmels aan hun voedsel?

De biodiversiteit van schimmels is enorm. De meest recente schattingen voorspellen tussen de 2.2 en 3.8 miljoen soorten (3). We kennen nog maar een heel beperkt aantal soorten-schimmels, ongeveer 100.000. De soorten die in mijn vakgebied (Biotechnologie van schimmels) het meest interessant zijn, zijn de schimmels die in de bodem leven en groeien. Om daar te kunnen groeien hebben schimmels voedingsstoffen nodig en met name zijn suikers belangrijk als koolstofbron. Net als wij mensen kunnen schimmels die suikers verbranden om daar energie uit te halen om te kunnen groeien. Die suikers of suikermoleculen die krijgt de schimmel over het algemeen niet cadeau, maar daar moet de schimmel hard voor werken. Zoals gezegd, de meeste schimmels zijn bodemschimmels en ze voeden zich daar door het afbreken van organisch materiaal en dit is meestal het restmateriaal van planten. Het plantenmateriaal zoals een blad, een dode wortel, of een knol, is opgebouwd uit complexe suikerverbindingen. Een ander woord voor suiker is een sachariden en deze complexe suikermoleculen worden dan ook wel polysachariden genoemd. Dit zijn stabiele, grote moleculen die de schimmel niet direct als suikerbron kan gebruiken. Voordat een schimmel deze complexe polysachariden kan benutten als koolstofbron moeten ze afgebroken worden tot monosachariden, zoals bijvoorbeeld

glucose, dat wel door de schimmel opgenomen kan worden. Het afbreken van polysachariden naar monosachariden gaat niet vanzelf en om dit mogelijk te maken zijn enzymen nodig. Deze plantenbiomassa-afbrekende enzymen zijn eiwitten die door de schimmel van nature worden geproduceerd. Door het maken en uitscheiden van de enzymen worden de complexe polysachariden omgezet tot monosachariden die de schimmel kan opnemen en gebruiken als energiebron. Ik zal hier later nog verder in detail op ingaan.

Voordat ik dat doe wil ik graag een beeld schetsen van hoe het moet zijn voor een schimmel om op deze manier aan voedsel te komen. Veel van het onderzoek dat gedaan wordt in mijn onderzoeksgroep wordt gedaan met de schimmel *Aspergillus niger*. Het is een veel voorkomende schimmel in de grond en maakt van nature een grote verscheidenheid aan enzymen die dood plantmateriaal kunnen afbreken. Echter, in zijn natuurlijke omgeving is *Aspergillus niger* niet het enige micro-organisme in de grond. Onderzoekers hebben laten zien dat in 1 theelepel vruchtbare grond zich meer dan 100 miljoen bacteriën kunnen bevinden en dat er meer dan 400 soorten schimmel aanwezig kunnen zijn. De totale lengte van alle schimmeldraden in dat theelepeltje grond is meer dan 200 meter (4). Dat geeft maar aan hoe complex die systemen zijn. Om zich te kunnen handhaven in deze omgeving met al die micro-organismen die elkaar beconcurreren voor het aanwezige voedsel, zetten schimmels speciale wapens in om bijvoorbeeld de groei van bacteriën of andere schimmels tegen te gaan. *Aspergillus niger* heeft de eigenschap om tijdens de groei zijn omgeving sterk te verzuren. Dit doet *Aspergillus* door verschillende zuren te produceren. Door het uitscheiden van bijvoorbeeld citroenzuur, oxaalzuur of gluconzuur wordt de zuurgraad in de directe omgeving van de schimmel heel laag (pH3) en daar kunnen een heleboel bacteriën en andere schimmels niet goed tegen en worden dus in hun groei geremd. Een ander voorbeeld zijn schimmels van de *Penicillium* familie. Veel *Penicillium* soorten zijn in staat om penicilline te maken en dat is één van de bekendste antibiotica om bacteriegroei tegen te gaan en dat wij als medicijn kennen.

Sommige schimmels zoals *Aspergillus niger* of *Penicillium notatum* hebben van nature interessante eigenschappen en deze organismen zijn door Biotech bedrijven verder doorontwikkeld tot belangrijk biotechnologische werkpaarden voor de productie van bijvoorbeeld penicilline, citroen zuur en enzymen. Bijna al het citroenzuur wat gebruikt wordt in de voedingsindustrie wordt geproduceerd door *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* is ook een van de belangrijkste organisme voor het produceren van eiwitten. De eiwitten die met *Aspergillus niger* worden geproduceerd zijn divers en hebben verschillende industriële toepassingen. Zo worden bijvoorbeeld door *Aspergillus niger* geproduceerde pectine-afbrekende enzymen gebruikt voor het helder maken van appelsap, of worden eiwit-afbrekende enzymen toegevoegd aan wasmiddelen om vlekken beter te verwijderen. Veel van het onderzoek wat we doen heeft te maken met het verbeteren van *Aspergillus niger* als eiwitfabriek en we doen dat via moleculair genetische technieken.

Mijn inspiratie voor de moleculaire genetica

Voordat ik verder in detail ga treden over het onderzoek wil ik graag een aantal minuten besteden en met u delen over wat fundamenteel is geweest voor mijn ontwikkeling als wetenschapper en mijn inspiratiebron om via genetische en moleculair genetische aanpakken onderzoek te doen. Een artikel uit 1980 in het toonaangevende tijdschrift "Cell" van de toen nog redelijke onbekende Randy Schekman met als titel: "Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway", was een belangrijke inspiratie bron (5). Ik las het artikel tijdens mijn studententijd terwijl ik een scriptie aan het schrijven was over SEC7, één van de mutanten die in deze eerdere studie was geïsoleerd. Deze studie uit 1980 is voor mij altijd een voorbeeld studie geweest van hoe je de kracht van een goede mutant screen kunt gebruiken om genen te identificeren die je kunnen helpen om het proces waar je in geïnteresseerd bent beter te begrijpen. Schekman is uitgegroeid tot een hele belangrijke wetenschapper en in 2013 heeft hij samen met twee collega onderzoekers de Nobel prijs heeft gekregen voor zijn baanbrekende onder-

zoek voor het ontrafelen van moleculaire mechanismen met betrekking tot het proces van eiwitsecretie.

De scriptie over SEC7 schreef ik onder begeleiding van mijn latere co-promotor Dr. Frans Klis. Tijdens mijn promotie-onderzoek heb ik de kans gekregen om een grote collectie celwandmutanten te isoleren en genetisch te karakteriseren. Die collectie van celwandmutanten heeft geleid tot een aantal mooie ontdekkingen met als hoogtepunt toch wel de ontdekking van het gen dat codeert voor het beta-1,3-glucaan synthase in bakkersgist (6, 7). Misschien nog wel belangrijker dan dat is dat we in die tijd ook beseften dat er een soort van celwand reparatie mechanisme aanwezig was. Samen met een aantal andere groepen groeide het besef van een "cell wall repair" mechanisme (8) en dat is een belangrijk concept geworden in het veld.

Na mijn promotie heb ik de kans gekregen op in Leiden samen met de toen net benoemde Hoogleraar Kees van den Hondel, een groep op te zetten om te werken aan eiwitsecretie en celwandsynthese in filamenteuze schimmels. Met Kees deel ik de passie voor moleculaire genetica en het heeft me altijd veel plezier gebracht om daar samen over te filosoferen, zoals je dat altijd zegt, en met promovendi hebben we een aantal mooie en succesvolle mutant screens opgezet voor het isoleren van celwandmutanten in *Aspergillus niger* (9). De screens hebben onder andere geleid tot het ontdekken van alle genen die betrokken zijn bij de biosynthese van galactofuranose-bevattende celwandpolymeren (10) en een methode opgeleverd om te zoeken naar nieuwe antischimmel middelen (9).

Regulatie van genexpressie

Een belangrijk aspect dat ik nog niet heb besproken met betrekking tot het maken van plantenbiomassa-afbrekende enzymen door schimmels is dat de schimmels dit op een zeer controleerde manier doen. De plantenbiomassa kan bestaan uit verschillende componenten en voor elke component zijn bepaalde enzymen nodig. Zo kan zetmeel alleen maar door zetmeel-afbrekende enzymen worden afgebroken en wordt

pectine, een belangrijk onderdeel van plantencelwand, alleen door pectinases afgebroken.

Het bijzondere en tegelijkertijd ook elegante is dat schimmels de enzymen die ze nodig hebben voor de afbraak van een bepaald polysacharide alleen maar maken als dat polysacharide aanwezig is. Dus schimmels maken alleen zetmeel-afbrekende enzymen als er zetmeel aanwezig is en maken alleen pectinases (pectine-afbrekende) enzymen als er pectine aanwezig is. Veel van ons onderzoek in de laatste jaren is gericht om beter te begrijpen hoe dit op moleculair niveau in de cel wordt geregeld. We doen dat onder andere door het maken en analyseren van mutanten waarbij de regulatie is verstoord en de enzymen ook gemaakt worden als de specifieke koolstof bron niet aanwezig is. Het idee is ook dat we deze kennis kunnen toepassen om uiteindelijke de productie van enzymen door bijvoorbeeld *Aspergillus* te verhogen en te verbeteren.

Aspergillus niger heeft ongeveer 11.000 genen. Een gen is een stukje DNA dat kan worden vertaald naar een eiwit. Elk gen codeert dus voor een eiwit, maar niet alle genen komen tegelijk tot expressie. Er is ongeveer een core set van 3000 genen die onder verschillende omstandigheden altijd tot expressie komen, maar een groot deel van de genen komt alleen onder specifieke omstandigheden tot expressie. Bepalend in mijn carrière is dat in de periode na 2005 de technologisch ontwikkelingen op het gebied van DNA sequenzen en het analyseren genexpressie met behulp van microarrays en RNA sequenzen in een stroomversnelling raakte. Het is dankzij Prof. Dr. Jack Pronk van de TU Delft als motor en initiator dat het Kluiver Centrum voor Industriële Fermentatie er gekomen is. Met Kees van den Hondel als voortrekker voor het *Aspergillus* onderzoek binnen het Kluiver Centrum hebben we met industrieën zoals DSM samen de systeem biologische technieken voor *Aspergillus niger* kunnen opzetten.

Eerder vertelde ik al dat de enzymen die betrokken zijn bij bijvoorbeeld de afbraak van zetmeel alleen tot expressie komen

als er zetmeel aanwezig is. Er wordt in de wereld veel onderzoek gedaan aan de regulatie van genexpressie en het “overall principe” hoe dat in de cel wordt bewerkstelligd is goed beschreven. Essentieel in dit proces van transcriptie regulatie zijn zogenoemde transcriptie factoren. Transcriptie factoren zijn eiwitten die aan DNA kunnen binden en die er voor kunnen zorgen dat een bepaald gen wel (of niet) tot expressie komt. Transcriptie factoren kunnen binden aan het DNA en doen dat aan het DNA dat net voor het DNA ligt dat codeert voor een eiwit. Door de binding van een transcriptie factor aan het DNA dat “upstream” ligt van het gen kan een gen worden afgeschreven tot messenger RNA en uiteindelijk worden vertaald naar een eiwit. Transcriptie factoren kunnen dus beschouwd worden als een soort van schakelaar die er voor kan zorgen dat een gen aan of uit kan staan.

Eerder onderzoek in ons lab heeft laten zien dat er voor het afbreken van zetmeel door *Aspergillus niger* vier enzymen nodig zijn. Voor een efficiënte afbraak is wel noodzakelijk dat deze vier genen min of meer tegelijkertijd tot expressie komen. Zoals gezegd kunnen transcriptie factoren binden aan DNA. De binding van een transcriptie factor is niet random, maar de transcriptie factor bindt aan een hele specifieke DNA volgorde. De transcriptie factor die belangrijk is voor het tot expressie komen van zetmeel-afbrekende enzymen is de AmyR transcriptie factor. AmyR kan aan het DNA binden als de DNA sequentie bestaat uit een herhaling van twee CGG nucleotide triplets die gescheiden worden acht willekeurige nucleotiden (CGGN-₈CGG). Omdat in de promotor gebieden van alle vier de genen die coderen voor zetmeel-afbrekende enzymen deze specifieke sequentie zit kan de AmyR transcriptie factor hieraan binden. Het gevolg is dus dat bij activatie van de AmyR transcriptie factor deze transcriptie factor heel specifiek aan het DNA bindt en er voor zorgt dat deze genen tegelijk tot expressie komen en dus alle vier de eiwitten tegelijk geproduceerd worden (11).

In het onderzoek van de afgelopen jaren hebben we ook veel werk gedaan aan een andere transcriptie factor die heel spe-

cifiek genen induceert die coderen voor eiwitten die pectine kunnen afbreken. Pectine is ook een onderdeel van de plantencelwand, maar de structuur van pectine is veel complexer dan de structuur van zetmeel. Omdat voor elke verbinding in een suikermolecuul een uniek enzym nodig is om het af te breken zijn er geen vier maar wel meer dan 30 enzymen nodig voor een efficiënte afbraak van pectine. De transcriptie factor die de expressie van de pectinases regelt noemen we GaaR. Deze transcriptie factor hebben we samen met Dr. Jan van Kan van Wageningen Universiteit en Prof. Ronald de Vries van het Westerdijk Instituut ontdekt in *Aspergillus niger* en beschreven (12).

Het is interessant dat we nu voor zetmeel en pectine de verantwoordelijke transcriptie factor weten maar de logische vervolgvraag is hoe deze transcriptie factoren geactiveerd worden. Een groot deel van ons onderzoek is er dan ook op gericht om te begrijpen hoe deze activatie plaatsvindt. Zoals ik al had gezegd, zijn de transcriptie factoren te vergelijken met aan-uit schakelaars en moet de aanwezigheid van het polysaccharide er voor zorgen dat de schakelaar aan gaat. Op dit gebied is er nog heel veel onderzoek nodig want voor maar heel weinig transcriptie factoren is het in detail bekend hoe precies de transcriptie factor geactiveerd wordt. Een van de systemen waar we in de groep hard aan werken is aan het AmyR systeem. Samen met Dr Sebastiaan Geibel, een expert op het gebied van eiwit structuur en interacties, hopen we in de toekomst op zoek gaan naar eiwitten die de activiteit van AmyR bepalen en controleren.

We weten al iets meer van een andere transcriptie factor die ik eerder heb genoemd en die betrokken is bij de regulatie van de expressie van de pectinases (GaaR). Onze kennis hierover komt voort uit een grote collectie *Aspergillus niger* mutanten die we hebben geïsoleerd. Normaal gesproken worden de pectinases alleen gemaakt in de aanwezigheid van pectine, of de belangrijkste bouwsteen van pectine (galacturonzuur). Wat deze mutanten bijzonder maakt en waar ze ook op zijn geselecteerd, is dat ze de pectinases maken ook in de afwezigheid van

pectine of galacturonzuur. Met andere woorden, de regulatie, het aan- en uitzetten van het systeem is verstoord en in de mutanten staat dus de GaaR schakelaar altijd aan. Door het sequencen van de genomen van deze mutanten in samenwerking met Prof. Adrian Tsang van Concordia University in Montreal hebben we een nieuw eiwit gevonden dat belangrijk is bij het voorkomen van activatie van de transcriptie factor (13).

De kennis die we met het onderzoek opdoen kan gebruikt worden om de productie van enzymen in industriële stammen te verbeteren.

Het verbeteren van *Aspergillus niger* als een eiwitfabriek

Binnen de industriële biotechnologie is *Aspergillus niger* één van de belangrijkste gastheren voor de productie van eiwitten. Om de productie van eiwitten zo efficiënt mogelijk te laten zijn, zijn een aantal factoren belangrijk. Door de ontdekking van CRISPR/Cas systemen zijn ook de mogelijkheden en de snelheid van het genetisch modificeren van *Aspergillus niger* sterk verbeterd. We hebben het CRISPR/CAS systeem zo snel mogelijk omarmd en geschikt gemaakt om ook te kunnen toepassen in *Aspergillus niger* (14). Met dit systeem hebben we een methode bedacht waardoor het relatief eenvoudig is om een gen van interesse in veelvoud in te brengen in een gemodificeerde *Aspergillus niger* stam. Deze stam is aangepast zodat de stam bijvoorbeeld veel minder proteases maakt waardoor de kans dat het eiwit dat geproduceerd wordt stabiel blijft groter is (15). Met collega's van Universiteit Groningen (Gwen Tjalling en Prof. Marco Fraaije) hebben we laten zien dat dit systeem geschikt is voor de productie en karakterisering van niet *Aspergillus* eiwitten (16). Ondertussen hebben we dit expressie systeem weer verder verbeterd en lopen er nu met verschillende onderzoeksgroepen samenwerkingen om het systeem te gebruiken. Ik verwacht en hoop dat dit systeem om eiwitten te produceren een veel gebruikt systeem gaat worden voor fundamenteel onderzoek, maar denk ook dat het een belangrijke tool is voor het verbeteren van productie van enzymen of eiwitten met industriële toepassingen of in de voedingsindustrie.

Het IBL en het onderwijs

Het Instituut Biologie Leiden (IBL) is een mooi instituut waarin veel en divers onderzoek plaatsvindt. Onderzoekers doen niet alleen onderzoek, maar geven ook het onderwijs. Het Instituut Biologie verzorgt samen met Naturalis, het Centrum voor Milieuwetenschappen Leiden en de Hortus, de Biologie opleidingen. Op deze manier kan ons Instituut een belangrijke bijdrage leveren aan een van de belangrijkste kernwaarden van onze universiteit namelijk het doen van toonaangevend onderzoek en geven van excellent onderwijs vanuit een breedte aan wetenschapsgebieden.

Alle stafmedewerkers, ondersteund door post-docs en PhD studenten, behorend bij die verschillende instituten, dragen vanuit hun expertise bij aan het onderwijs. Voor mij is het lesgeven, het stimuleren van de interesses, en het overbrengen van kennis een belangrijk en leuk aspect van het werk. Dat zit ook een beetje in de genen als u bedenkt dat alle vier mijn grootouders werkzaam waren in het onderwijs, en dat ook mijn beide ouders hun hele werkzame leven les hebben gegeven. Naast het, tegenwoordig begeleiden van het onderzoek en het begeleiden van stagestudenten, is het ook gebruikelijk dat de onderzoekers in het Instituut ervoor zorgen voor het cursorisch onderwijs. Samen met verschillende collega's verzorg ik een aantal cursussen op het gebied van Chemie, Microbiologie, Moleculaire Microbiologie, Systeem Biologie en de Industriële Biotechnologie. Het leuke is dat dit hele verschillende cursussen zijn, verspreid over verschillende jaren en variërend van mogelijk redelijk saai, om niet te zeggen langdradige hoorcolleges, tot heel interactief onderwijs bijvoorbeeld in de Industriële Biotechnologie cursus. In de loop van de jaren hebben we enorme ervaring opgedaan op het gebied van de schimmelgenetica met *Aspergillus niger* en is het één van de uitdagingen voor de komende jaren om deze kennis of ieder geval aspecten daarvan over te dragen en vast te leggen. Plannen, ideeën en de ambitie om een (internationale) master cursus schimmelgenetica en schimmelbiotechnologie op te zetten worden steeds

sterker en ik hoop hier samen met een aantal collega's in de komende jaren vervolg aan te geven.

Behalve groepsleider en docent ben ik ook voorzitter van de examencommissie Biologie. Elke opleiding en dus ook de Bachelor en Master opleidingen Biologie aan de Leidse Universiteit heeft een examencommissie. De examencommissie heeft als belangrijkste taak om de kwaliteit van het door de studenten behaalde diploma te kunnen garanderen. Samen met mijn collega Examencommissie leden (Nicole, Krijn, David, Akos, Katharina en Yali) en collega's binnen het ambtelijk secretariaat (Sandra, Veerle, Tim en Naoual) verzetten we veel werk om die kwaliteitsborging van onze opleiding goed te laten verlopen. Met Marcel Schaaf, Dennis Claessen en Annemarie Meijer heb ik de laatste twee jaar intensief samengewerkt om te werken aan het verbeteren van een aantal aspecten binnen onze opleiding waaronder het functioneren van de examencommissie. Ik ben trots op wat we met zijn allen de laatste twee jaar hebben verbeterd en ik zie de toekomst dan ook met vertrouwen tegemoet.

9

Dankwoord

Bijna aan het eind gekomen van mijn oratie wil ik nog enige woorden van dank uitspreken. Ik wil het College van Bestuur en het Faculteitsbestuur bedanken voor mijn benoeming tot hoogleraar Schimmelgenetica en Biotechnologie. Ik dank in het bijzonder ook Prof. Gilles van Wezel, wetenschappelijk directeur van het IBL, voor zijn bijdrage en support om de benoeming mogelijk te maken.

Onderzoek doen doe je niet alleen en met het schrijven en nadenken over deze oratie komen er weer veel herinneringen boven. Het is onmogelijk om al die samenwerkingen hier te noemen, maar het is mooi om te zien dat een groot aantal collega's met wie ik de afgelopen 33 jaar heb mogen samenwerken hier aanwezig zijn. Collega's Prof. Vera Meyer en Prof. Han Wösten en de al eerder genoemde Prof. Adrian Tsang wil ik

graag met naam noemen en bedanken vanwege het grote aantal succesvolle samenwerkingen over langere tijd.

Misschien nog wel belangrijker dan de collega groepsleiders zijn de PhD studenten, post-docs en alle gastmedewerkers en studenten die in de afgelopen 25 jaar een bijdrage hebben geleverd aan het schimmelonderzoek in Leiden. Een grote groep mensen waar ik met ontzettend veel plezier mee heb samengewerkt en waarbij mooie ontdekkingen zijn gedaan. Robbert, Caroline, Xavier, Xiaolian, Neuza, Benjamin, Angeli-que, Min Jin, Jing, Ebru, Anne-Marie, Tim, Sjoerd, zijn de PhD studenten waar ik promotor of co-promotor van mocht zijn, dank voor al jullie inzet. Dank aan alle andere medewerkers en in het bijzonder Hwa, Laszlo, Roland, Selina en Prajeesh die recent meestal als post-doc succesvol bij hebben gedragen aan het onderzoek. Ik ben nog niet klaar met jullie want er moeten nog veel publicaties de deur uit.

10

Ik dank Frans Klis die als promotor een essentiële rol heeft gespeeld in mijn wetenschappelijk ontwikkeling en die me de kans heeft gegeven om de mooie gistmutanten collectie te maken. Ik wil Frans ook bedanken voor al zijn hulp en het leermeester zijn bij het schrijven van artikelen ook na de promotie-tijd.

Ik wil graag Kees van den Hondel bedanken die mij als gist-jochie de kans heeft gegeven om een Aspergillus-meneer te worden. Na je pensionering in 2010 ben je nog ruim 12 jaar actief betrokken geweest bij het onderzoek en op zo'n manier dat je me ook de kans hebt gegeven om mijn eigen interesses en ideeën verder te ontwikkelen.

Ik dank Jaap Visser, die met zijn ervaring in het Aspergillus werk en zijn contacten in de industrie ervoor gezorgd heeft dat een aantal belangrijke samenwerkingsprojecten tot stand zijn gekomen en fijn dat je tot op de dag van vandaag ben je actief betrokken bij het onderzoek.

Peter Punt levert als bijzonder hoogleraar Schimmelbiotechnologie een belangrijke bijdrage aan het onderwijs en aan het onderzoek door het begeleiden van de PhD studenten. Met Han de Winde en Joost van den Brink vormen we tegenwoordig de werkgroep Industriële Biotechnologie. Dank Peter, Han en Joost voor deze fijne samenwerkingen.

Een speciaal woord van dank aan Mark Arentshorst. Mark is al meer dan 23 jaar mijn linker- en rechterhand in het lab, hij zorgt ervoor dat alles in het lab draait en soepel verloopt. Hij ook degene die nieuwe onderzoekslijnen kan verkennen en er voor zorgt dat het laatste experimentje dat uitgevoerd moet worden om een publicatie af te kunnen ronden snel gedaan wordt. Nieuwe medewerkers of gasten staan versted wat hij aan verschillende experimenten op een dag kan uitvoeren en het is geweldig om al 23 jaar met je samen te werken.

Ik dank verder nogmaals de examencommissieleden, de Biologie taskforce onder leiding van Annemarie Meijer, alle ondersteuning van het secretariaat, het bestuur van de Leidse Biologen Club, alle collega's van het opleidingsbureau, en Davy de Witt die in zijn eentje de microbiologische keuken runt en zorgt dat de hele microbiologie afdeling dagelijks van medium en schoon glaswerk wordt voorzien.

Ik vind het studeren en het werk fantastisch, inspirerend en uitdagend, maar niets zo belangrijk als een stabiele en liefdevolle thuisbasis. In eerste instantie vond ik die basis thuis bij mijn ouders. Ik dank mijn ouders voor het veilige nest waarin ik kon opgroeien waar ik gestimuleerd werd om te sporten en te studeren. Mijn moeder is helaas in 2014 overleden, maar ze kijkt mee en is supertrots. De titel van deze voordracht is ook een beetje voor mijn moeder. Ze hield van cryptogrammen en woordgrapjes.

Dank je lieve, lieve Ebru voor de liefdevolle thuisbasis van nu waardoor het elke dag weer fijn is om thuis te komen en thuis te zijn. Het is geweldig om met jou de hoogtepunten en

teleurstelling in het werk maar ook daarbuiten te kunnen delen. Dank je voor je onvoorwaardelijke steun, je begrip en je vermogen om me op een positieve manier te stimuleren en me er af en toe op te wijzen wat echt belangrijk is. Ik zie ernaar uit om samen met jou, Efe en Mavi, de komende jaren verder te groeien en dat we onze dromen die we samen nog hebben kunnen verwezenlijken.

Ten slotte, geachte aanwezigen, dank ik u zeer voor het bijwonen van mijn voordracht.

Ik heb gezegd.

Referenties

- 1) Anderson JB, Bruhn JN, Kasimer D, Wang H, Rodrigue N, Smith ML. Clonal evolution and genome stability in a 2500-year-old fungal individual. *Proc Biol Sci.* 2018; 285 (1893):20182233. doi: 10.1098/rspb.2018.2233.
- 2) Meyer V, Basenko EY, Benz JP, Braus GH, Caddick MX, Csukai M, de Vries RP, Endy D, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N, Haarmann T, Hadar Y, Hansen K, Johnson RI, Keller NP, Kraševc N, Mortensen UH, Perez R, Ram AFJ, Record E, Ross P, Shapoval V, Steiniger C, van den Brink H, van Munster J, Yarden O, Wösten HAB. Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biol Biotechnol.* 2020; 7:5. doi: 10.1186/s40694-020-00095-z.
- 3) Hawksworth DL, Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr.* 2017; 5(4). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
- 4) Merckx V. Onderzoekers gaan gigantische ondergrondse schimmelnetwerken in kaart brengen. Interview Radio 1 journaal. 30 November 2021
- 5) Novick P, Field C, Schekman R. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell.* 1980; 21(1):205-15. doi: 10.1016/0092-8674(80)90128-2.
- 6) Ram AF, Wolters A, Ten Hoopen R, Klis FM. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast.* 1994; 10(8):1019-30. doi: 10.1002/yea.320100804.
- 7) Ram AF, Brekelmans SS, Oehlen LJ, Klis FM. Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1995; 358(2):165-70. doi: 10.1016/0014-5793(94)01418-z.
- 8) Ram AF, Kapteyn JC, Montijn RC, Caro LH, Douwes JE, Baginsky W, Mazur P, van den Ende H, Klis FM. Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol.* 1998; 180(6):1418-24. doi: 10.1128/JB.180.6.1418-1424.1998.
- 9) Damveld RA, Franken A, Arentshorst M, Punt PJ, Klis FM, van den Hondel CA, Ram AF. A novel screening method for cell wall mutants in *Aspergillus niger* identifies UDP-galactopyranose mutase as an important protein in fungal cell wall biosynthesis. *Genetics.* 2008; 178(2):873-81. doi: 10.1534/genetics.107.073148.
- 10) Tefsen B, Ram AF, van Die I, Routier FH. Galactofuranose in eukaryotes: aspects of biosynthesis and functional impact. *Glycobiology.* 2012;22(4):456-69. doi: 10.1093/glycob/cwr144.
- 11) Gomi K. Regulatory mechanisms for amyolytic gene expression in the koji mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019; 83(8):1385-1401. doi: 10.1080/09168451.2019.1625265
- 12) Alazi E, Niu J, Kowalczyk JE, Peng M, Aguilar Pontes MV, van Kan JA, Visser J, de Vries RP, Ram AF. The transcriptional activator GaaR of *Aspergillus niger* is required for release and utilization of D-galacturonic acid from pectin. *FEBS Lett.* 2016; 590(12):1804-15. doi: 10.1002/1873-3468.12211.
- 13) Niu J, Alazi E, Reid ID, Arentshorst M, Punt PJ, Visser J, Tsang A, Ram AF. An evolutionarily conserved transcriptional activator-repressor module controls expression of genes for D-Galacturonic acid utilization in *Aspergillus niger*. *Genetics.* 2017; 205(1):169-183. doi: 10.1534/genetics.116.194050.
- 14) van Leeuwe TM, Arentshorst M, Ernst T, Alazi E, Punt PJ, Ram AFJ. Efficient marker free CRISPR/Cas9 genome editing for functional analysis of gene families in filamentous fungi. *Fungal Biol Biotechnol.* 2019;6:13. doi: 10.1186/s40694-019-0076-7.
- 15) Arentshorst M, Kooloth Valappil P, Mózsik L, Regensburg-Tuink TJG, Seekles SJ, Tjallinks G, Fraaije MW, Visser J, Ram AFJ. A CRISPR/Cas9-based multicopy integration system for protein production in *Aspergillus niger*. *FEBS J.* 2023;290(21):5127-5140. doi: 10.1111/febs.16891.
- 16) Tjallinks G, Boverio A, Maric I, Rozeboom H, Arentshorst M, Visser J, Ram AFJ, Mattevi A, Fraaije MW. Structure elucidation and characterization of patulin synthase, insights into the formation of a fungal mycotoxin. *FEBS J.* 2023;290(21):5114-5126. doi: 10.1111/febs.16804.

PROF.DR. A.F.J. RAM



- 1986 Eindexamen VWO, Bonhoeffer College, Castricum
- 1991 Doctoraal Biologie, Universiteit van Amsterdam (cum laude)
- 1996 Promotie Universiteit van Amsterdam. Titel proefschrift:
“Isolation and characterization of Calcofluor White hypersensitive mutants involved in the synthesis of β -glucan in *Saccharomyces cerevisiae*”
- 1996-1997 Postdoctoraal onderzoeker afdeling Toegepaste Microbiologie en Gen Technologie, TNO Voeding, Zeist
- 1997-2002 Postdoctoraal onderzoeker Leiden Universiteit met als onderwerpen: Eiwitsecretie en celwandbiosynthese in *Aspergillus niger*, Instituut Moleculaire Plantkunde
- 2002-2006 Tenure Track positie Leiden Universiteit op het gebied van Schimmelgenetica, Instituut Moleculaire Plantkunde
- 2006-2011 Universitair Docent Moleculaire Microbiologie en Biotechnologie, Instituut Biologie Leiden
- 2011-2022 Universitair Hoofddocent (met ius promovendi) en groepsleider afdeling Moleculaire Microbiologie en Biotechnologie, Instituut Biologie Leiden
- 1 maart 2023 Benoeming Hoogleraar Schimmelgenetica en Biotechnologie, Instituut Biologie Leiden



Universiteit
Leiden