

**Daniel Stukenberg**

2014–2019 B. Sc. Biologie und M. Sc. Molekulare und Zelluläre Biologie an der Universität Marburg. 2019–2024 Promotion in der Gruppe von Prof. Dr. A. Becker am Zentrum für Synthetische Mikrobiologie (Synmikro) der Universität Marburg. Seit 2024 PostDoc an der TU Darmstadt

VAAM-Promotionspreis 2025

Entwicklung von effizienten genetischen Werkzeugen für *Vibrio natrie*gens

DANIEL STUKENBERG

MOLEKULARE MIKROBIOLOGIE, TU DARMSTADT

DOI: 10.1007/s12268-025-2456-2

© The Author(s) 2025

■ Aktuell werden in der Biotechnologie nur wenige gut erforschte Mikroorganismen eingesetzt, um beispielsweise Pharmazeutika herzustellen. Die verwendeten Organismen stellen daher nur einen verschwindend geringen Anteil der biologischen Vielfalt dar, was mögliche Anwendungsbereiche begrenzt. Aus diesem Grund ist die Etablierung von neuen Produktionsorganismen ein wichtiges Forschungsfeld.

Ein Bakterium mit interessanten Eigenschaften für zukünftige biotechnologische Anwendungen ist *Vibrio natrie*gens. Dieses Bakterium wurde bereits 1958 aus Salzwiesen isoliert und hat eine sehr kurze Verdopplungszeit von unter zehn Minuten, wodurch Arbeitsabläufe in Laboren und Produktionsanlagen beschleunigt werden können.

Bereits seit meiner Teilnahme am iGEM-Wettbewerb 2018 arbeite ich daran, das Potenzial von *V. natrie*gens zu erschließen. Dabei fokussiere ich mich auf die Entwicklung von genetischen Werkzeugen. Zusammen mit dem Marburger iGEM-Team startete ich mit der Arbeit an der *Marburg Collection*, einer Sammlung von fast 200 charakterisier-

ten und standardisierten DNA-Bausteinen, die für die effiziente Konstruktion von Plasmiden verwendet werden können [1].

Zu Beginn meiner Promotion arbeitete ich an einer neuen Strategie für die effiziente Veränderung des Genoms von *V. natrie*gens. Zu diesem Zweck entwickelte ich *NT-CRISPR*, eine Methode, die die natürliche Transformation von *V. natrie*gens mit einer Gegenselektion durch CRISPR-Cas9 kombiniert. Die Zellen nehmen dabei aktiv DNA auf und bauen diese in ihr Genom ein. Anschließend wird CRISPR-Cas9 aktiviert, um unveränderte Zellen selektiv abzutöten. Dadurch erreichte ich Effizienzen von bis zu 100 % und war außerdem in der Lage, drei Deletionen gleichzeitig durchzuführen [2].

Durch NT-CRISPR konnte ich außerdem eine spannende Frage zur Biologie von *V. natrie*gens beantworten: Das Genom von *V. natrie*gens besteht aus zwei Chromosomen. Lange wurde spekuliert, dass diese Aufteilung eine schnellere Replikation des Genoms und damit das schnelle Wachstum ermöglicht. Um dies zu testen, fusionierte ich die beiden Chromosomen. Überraschenderweise zeigte der resultierende Stamm keine wesentlichen Wachstumsunterschiede zum

Wildtyp, woraus sich schließen lässt, dass das zweigeteilte Genom keine Voraussetzung für schnelles Wachstum ist [3].

Neben der permanenten genomischen Veränderung mit NT-CRISPR entwickelte ich mit *graded-CRISPRi* eine weitere Methode für die zielgerichtete Genregulation in *V. natrie*gens. Hierbei verwendete ich eine katalytisch inaktive Cas9, um die Transkription eines Zielgens zu unterbinden. Unter Nutzung von verschiedenen gRNA-Varianten erzielte ich eine abgestufte Hemmung der Zielgene, was es ermöglicht, den Zusammenhang zwischen Expressionsstärke eines Gens und dem daraus resultierenden Phänotyp zu untersuchen [4]. ■

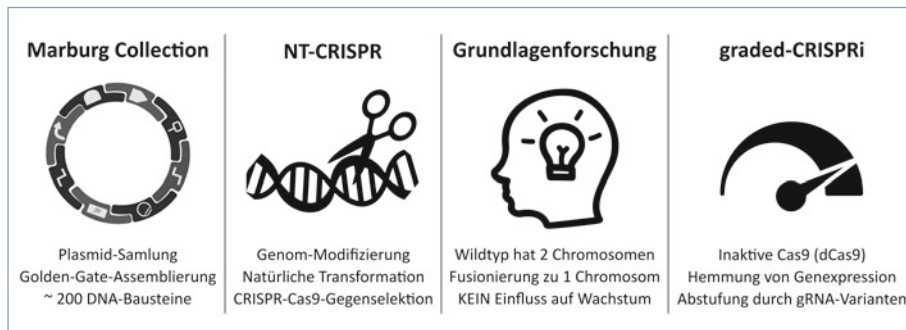
Literatur

- [1] Stukenberg D, Hensel T, Hoff J et al. (2021) The Marburg Collection: A Golden Gate DNA Assembly Framework for Synthetic Biology Applications in *Vibrio natrie*gens. ACS Synth Biol 10: 1904–1919
- [2] Stukenberg D, Hoff J, Faber A et al. (2022) NT-CRISPR, combining natural transformation and CRISPR-Cas9 counterselection for markerless and scarless genome editing in *Vibrio natrie*gens. Comm Biol 5: 265
- [3] Ramming L, Stukenberg D, Sánchez Olmos MC et al. (2024) Rationally designed chromosome fusion does not prevent rapid growth of *Vibrio natrie*gens. Comm Biol 7: 519
- [4] Stukenberg D, Faber A, Becker A (2024) Graded-CRISPRi, a Tool for Tuning the Strengths of CRISPRi-Mediated Knockdowns in *Vibrio natrie*gens Using gRNA Libraries. ACS Synth Biol 13: 2091–2104

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Daniel Stukenberg
Molekulare Mikrobiologie
TU Darmstadt
Schnittspahnstraße 14
D-64289 Darmstadt
daniel.stukenberg@tu-darmstadt.de



▲ **Abb. 1:** Übersicht über die beschriebenen Projekte. Verschiedene Methoden wurden entwickelt, die die Assemblierung von komplexen Plasmiden erlaubt (Marburg Collection) sowie das Genom zu verändern (NT-CRISPR) oder Genexpression zu regulieren (graded-CRISPRi). Zudem können die Methoden für Grundlagenforschung eingesetzt werden.