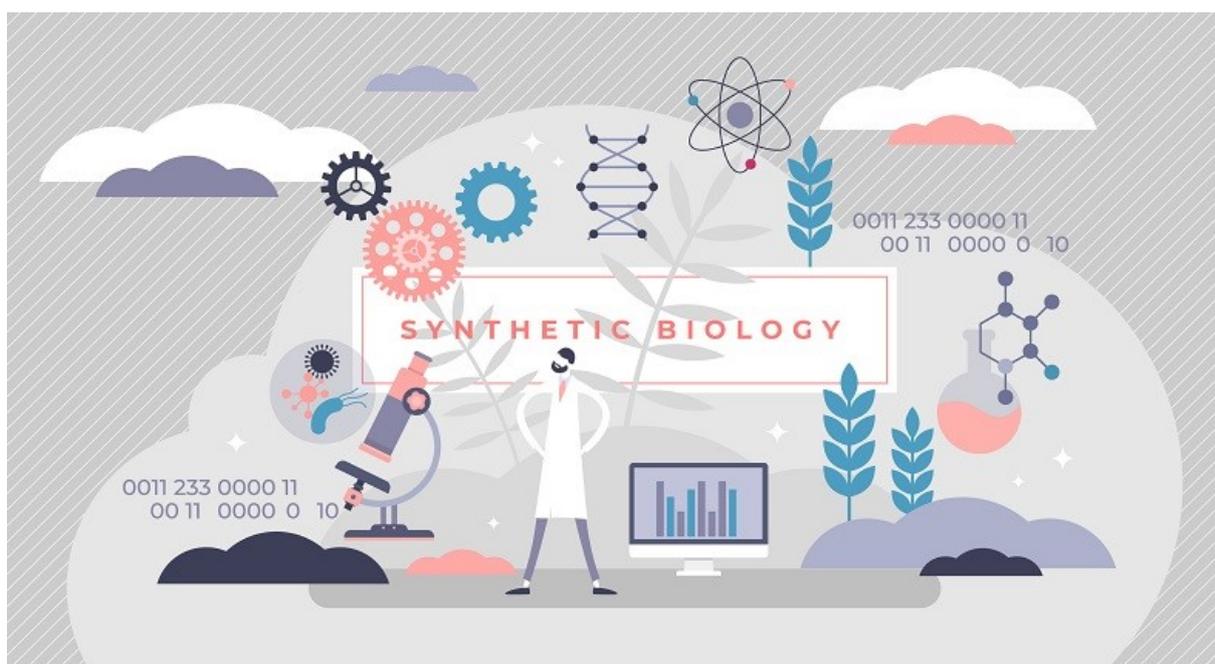


Synthetische Biologie



© VectorMine/stock.adobe.com

3. Zwischenbericht der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) Zeitraum: Juni 2018 – Dezember 2021

Inhalt

1	Einführung	3
2	Entwicklungen in den Forschungsfeldern der Synthetischen Biologie und Bewertung durch die ZKBS	3
2.1	Design und Synthese von Genen und Genomen	4
2.2	Design genetischer Schaltkreise	4
2.3	Design von maßgeschneiderten Stoffwechselwegen	5
2.4	Minimalzellen: Genomreduktion und Generierung von Protozellen	5
	<i>Top down</i> : Herstellung von Minimalzellen durch Genomreduzierung	5
	<i>Bottom up</i> : Herstellung von Protozellen	5
2.5	Xenobiologie	6
2.6	Methoden mit Einfluss auf die Synthetische Biologie	6
	Angewandte Methoden	7
	<i>In silico</i> -Methoden	7
3	Literatur	7

1 Einführung

Die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) führt seit mehr als zehn Jahren ein Monitoring der Synthetischen Biologie durch, um aktuelle wissenschaftliche Entwicklungen sachverständig und kritisch zu begleiten und hinsichtlich der biologischen Sicherheit zu bewerten. In den Jahren 2012 und 2018 wurden der erste und der zweite Zwischenbericht zu diesem Monitoring veröffentlicht. Während sich der erste Bericht auf Forschungsaktivitäten in Deutschland konzentrierte, betrachtete der zweite Zwischenbericht die wissenschaftlichen Entwicklungen weltweit.

Seit dem zweiten Zwischenbericht führt die ZKBS ein kontinuierliches Monitoring von Publikationen zur Synthetischen Biologie durch. Ausgewählte Publikationen, die nach Ansicht der ZKBS besonders typisch und relevant für die einzelnen Forschungsfelder der Synthetischen Biologie sind, werden regelmäßig auf der Homepage der ZKBS (https://www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/SynthetischeBiologie/02_AktEntwicklungen/AktEntwicklungen_node.html) vorgestellt.

Der vorliegende Bericht stellt die Entwicklungen in den verschiedenen Forschungsbereichen anhand der von der ZKBS für die Homepage ausgewählten Publikationen kurz vor, bewertet sie hinsichtlich einer potentiellen Gefährdung für die biologische Sicherheit und beurteilt, ob sie vom Geltungsbereich des Gentechnikgesetzes (GenTG) bzw. den Europäischen Richtlinien abgedeckt werden.

Für eine Einführung in den Bereich der Synthetischen Biologie wird auf die bereits veröffentlichten Zwischenberichte verwiesen.

2 Entwicklungen in den Forschungsfeldern der Synthetischen Biologie und Bewertung durch die ZKBS

Bislang existiert keine allgemeingültige Definition der Synthetischen Biologie. Die ZKBS konzentriert sich in ihrem Monitoring auf fünf Bereiche, die von Forschenden und anderen Stakeholdern generell als die Forschungsfelder der Synthetischen Biologie gesehen werden. Diese sind:

- Design und Synthese von Genen und Genomen
- Konzeption von genetischen Schaltkreisen
- Design von maßgeschneiderten Stoffwechselwegen
- Erzeugung von Minimalorganismen und Schaffung von künstlichen Zellen
- Xenobiologie.

Zudem listet die ZKBS seit 2018 auch Publikationen zu Methoden mit Einfluss auf die Synthetische Biologie auf ihrer Homepage auf. Im Folgenden werden die Ergebnisse des kontinuierlichen Monitorings kurz zusammengefasst. Für eine vollständige Liste der Kurzzusammenfassungen wird auf die Homepage der ZKBS verwiesen (https://www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/SynthetischeBiologie/02_AktEntwicklungen/AktEntwicklungen_node.html).

2.1 Design und Synthese von Genen und Genomen

Einige der bereits in den ersten beiden Berichten beschriebenen Entwicklungen wurden fortgeführt und erweitert. Beispielsweise wurde ein synthetisches *Escherichia coli*-Genom mit einer Größe von 4 Mbp synthetisiert, in welchem zudem zwei Kodons rekodiert wurden [1]. DNA als Speichermedium wurde zur dynamischen Datenspeicherung großer Datenmengen oder zur Aufzeichnung der Zellabstammung eingesetzt [2, 3]. Zur Standardisierung bei der Synthese von Genen und Genomen tragen synthetische Promotoren bei, die u. a. für Pflanzen [4] und für *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt wurden [5].

Bewertung der ZKBS: Wie bereits in den letzten beiden Zwischenberichten beschrieben, entwickeln sich die Möglichkeiten zur Synthese kompletter Genome ständig weiter. Ein *de novo*-Design von Genomen wurde jedoch weiterhin nicht vorgenommen, sodass sich *in vitro* synthetisierte Genome stark an natürlichen Vorbildern orientieren. Dadurch ist eine vergleichende Risikobewertung weiterhin möglich.

Die reine *in vitro*-Synthese von Genen und Genomen fällt nicht unter das GenTG, solange die hergestellten Nukleinsäureabschnitte nicht in das Genom lebender Organismen eingebracht werden. Werden neu synthetisierte und modifizierte Genome in lebende Organismen eingebracht, stellt dies eine gentechnische Arbeit gemäß GenTG dar, sofern diese Modifikationen nicht unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination vorkommen.

2.2 Design genetischer Schaltkreise

Geplante Anwendungen von genetischen Schaltkreise liegen in der Medizin und der Umweltdiagnostik vor. Genetische Schaltkreise scheinen einerseits komplexer zu werden, andererseits werden auch Bestrebungen zu einer stabileren Expression der Schaltkreise und ihrer *outputs* sowie eine Regulierung durch neuartige *inputs* beschrieben. Zudem sind mehr angewandte Beispiele zu beobachten. Beispiele für komplexe Schaltkreise sind die Verarbeitung multipler *inputs* durch ein metabolisches Perzeptron [6] oder flexible Logikgatter, die aus Proteinen aufgebaut sind und der posttranslationalen Kontrolle dienen [7]. Eine stabile Genexpression unabhängig von Kopienzahl oder der Lokalisation eines Schaltkreises im Genom wurde beispielsweise durch Segall-Shapiro *et al.* [8] oder Frei *et al.* [9] beschrieben. Neuartige *inputs* für Schaltkreise können z. B. elektrische Signale [10], photothermale Signale über LED-Licht [11] oder Licht [12, 13] sein. Genetische Schaltkreise werden für die Anwendung in der Krebstherapie erforscht. Sie können eingesetzt werden, um die Konzentration von Oberflächenproteinen (z. B. Antigendichte) oder microRNAs in einer Zelle zu messen und so gezielt Tumorzellen erkennbar zu machen, wodurch eine gezielte Abtötung dieser vermittelt werden kann [14–18]. Ein anderes Beispiel für eine Anwendung sind genetische Schalter, die in Gewebe eingearbeitet werden und so als tragbare Sensoren für kleine Moleküle, wie Toxine, fungieren [19].

Bewertung der ZKBS: Beim Design genetischer Schaltkreise werden genau definierte, meist in der Funktion gut charakterisierte DNA-Abschnitte miteinander kombiniert. Die Schaltkreise werden häufig unter Verwendung einer biologischen Sicherheitsmaßnahme in seit langem in der Forschung bekannte Modellorganismen eingebracht. Wie bereits in den letzten beiden

Zwischenberichten festgestellt, werden dabei gentechnisch veränderte Organismen erzeugt, die vom Geltungsbereich des GenTG erfasst werden.

2.3 Design von maßgeschneiderten Stoffwechselwegen

Maßgeschneiderte Stoffwechselwege werden beispielsweise genutzt, um die Biomasseproduktion in Pflanzen zu erhöhen oder neue Wege zur CO₂-Fixierung zu etablieren [20–22]. Ein neuer Weg der Carboxylierung zur besseren CO₂-Fixierung [23] kann dabei mit dem bereits im letzten Zwischenbericht beschriebenen CETCH-Zyklus [24] kombiniert werden. Auch die Produktion wirtschaftlich interessanter Moleküle, wie synthetischer Cannabinoide in *S. cerevisiae* sowie des Aromastoffes Vanillin aus einem PET-Abbauprodukt, wurden beschrieben [25, 26]. Stoffwechselwege wurden in Vesikel verlagert, um eine toxische Wirkung der entstehenden Produkte zu verhindern [27].

Bewertung der ZKBS: Für die Entwicklung neuartiger maßgeschneiderter Stoffwechselwege werden bestehende Gene modifiziert oder Gene eines anderen Organismus in einen bereits bestehenden Organismus eingebracht. Die gezielte Bildung gefährlicher Stoffe wäre dadurch möglich. Jedoch sind Herstellung und Umgang mit diesen Organismen vollständig durch das GenTG abgedeckt.

2.4 Minimalzellen: Genomreduktion und Generierung von Protozellen

Top down: Herstellung von Minimalzellen durch Genomreduzierung

Reduzierte Genome wurden u. a. für die Hefe *S. cerevisiae* entwickelt, indem essentielle Gene in einem Superchromosom gebündelt wurden [28] oder indem eines der 16 Chromosomen beispielhaft um 58 % reduziert wurde [29]. Im Bereich der Bakterien wurde z. B. das Genom von *Caulobacter ethensis* reduziert und zusätzlich 56 % aller Kodons durch synonyme Kodons ersetzt [30].

Bottom up: Herstellung von Protozellen

Die Herstellung minimaler Zellen aus biologischen Bausteinen konzentriert sich auf die Entwicklung verschiedener Funktionen, die „lebensfähige“ synthetische Zellen benötigen. Dies kann die Bildung von Kompartimenten wie einem artifiziellen Zellkern [31], von Strukturen zur Zellteilung [32] oder Zellbewegung [33, 34] oder zur Energieversorgung [35, 36] sein. Viele Arbeitsgruppen forschen zudem an der Kommunikation zwischen Protozellen, z. B. mithilfe von DNA [37, 38] oder kleinen Molekülen [39].

Bewertung der ZKBS: Minimalorganismen, die durch die gezielte Verkleinerung des Genoms erzeugt wurden, sind generell weniger anpassungsfähig an ihre Umwelt, womit eine reduzierte Fitness und ggf. auch eine reduzierte Pathogenität einhergeht. Die meisten dieser Organismen können nur unter definierten Bedingungen überleben, weswegen eine erhöhte Gefährdung der biologischen Sicherheit nicht zu erkennen ist. Das Gefährdungspotential kann wie im GenTG

vorgesehen durch den Vergleich der Organismen mit den Ausgangsorganismen gut abgeschätzt werden.

„Am Reißbrett“ entworfene Organismen des *bottom up*-Ansatzes fallen nicht unter das GenTG, welches auf Organismen angewendet wird, deren „genetisches Material in einer Weise verändert wurde, wie sie unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzung oder natürliche Rekombination nicht vorkommt“ (§ 3 GenTG). Gemäß GenTG wird das bekannte Gefährdungspotential des Spender- und Empfängerorganismus der Risikobewertung zu Grunde gelegt. Protozellen, die keinen natürlichen Organismus zur Grundlage haben, fallen demnach nicht unter das GenTG.

Bis heute wurde jedoch keine Protozelle beschrieben, die autonom repliziert und als Organismus gesehen werden kann. Aus diesem Bereich ist gegenwärtig kein Risiko für die biologische Sicherheit zu erwarten.

2.5 Xenobiologie

Im Bereich der Xenobiologie wurden einige Arbeiten zur Veränderung des genetischen Codes beschrieben. Zu diesen gehörte z. B. die Entwicklung eines *fail safe code*, bei dem jede Aminosäure von nur einem vier-Basen-Kodon kodiert wird, welches durch Mutation nicht in ein anderes Kodon überführt werden kann und so vor spontanen Mutation schützen soll [40]. Auch ein acht-Buchstaben-Alphabet, in welchem die natürlich vorkommenden Basen A, T, C und G durch synthetische Nukleotide ergänzt werden [41], oder neue Basenpaare auf der Basis von Metallen [42] wurden beschrieben. Arbeiten zu tRNAs, die beispielsweise *sense*-Kodons neu kodieren [43] oder vier-Basen-Kodons dekodieren [44], ergänzen diese Arbeiten. Zudem wurden einige Forschungsarbeiten zur Insertion von nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine beschrieben. Diese hatten beispielsweise eine Auxotrophie [45] zum Ziel. Bakterien, die eine 21. Aminosäure synthetisieren und in ein Protein einbauen können, wurden ebenfalls beschrieben [46].

Bewertung der ZKBS: Mithilfe der im Bereich der Xenobiologie verfolgten Ansätze werden Organismen erzeugt, deren genetisches Material in einer Weise verändert worden ist, wie sie unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht vorkommt. Dabei werden auch nicht-natürliche Basen als genetisches Material angesehen. Sie unterliegen demnach dem GenTG.

Viele Anwendungen aus dem Bereich der Xenobiologie zielen zudem auf Orthogonalität und somit auf eine verringerte Interaktion mit natürlichen Organismen ab. Dies kann zu einer Erhöhung der Biosicherheit führen.

2.6 Methoden mit Einfluss auf die Synthetische Biologie

Seit dem zweiten Zwischenbericht im Jahr 2018 hat die ZKBS in ihr kontinuierliches Monitoring auch Publikationen zu Methoden mit Einfluss auf die Synthetische Biologie aufgenommen. Diese werden in angewandte Methoden und *in silico*-, also computergestützte, Methoden aufgeteilt.

Angewandte Methoden

In diesem Bereich wurden Forschungsarbeiten zur Integration von Nukleinsäureabschnitten mithilfe von CRISPR/Cas9 [47], eine Sequenziermethode für eine nicht-natürliche Base [48], oder Arbeiten zur Datenspeicherung in DNA [49, 50] aufgelistet. Auch Ansätze zur Bildung, Teilung und Koloniebildung von Protozellvorstufen wurden beschrieben [51–53].

In silico-Methoden

Genetische Daten aus Anwendungen der Synthetischen Biologie können zum standardisierten Datenaustausch in die Sprache *Synthetic Biology Open Language* (SBOL) überführt werden. Um die oft ungeordneten Datensätze in Repositorien wie SynBioHub besser zugänglich zu machen, haben Zhang *et al.* [54] ein Programm zur Sortierung dieser Datensätze entwickelt.

Bewertung der ZKBS: Bei den hier aufgeführten angewandten Methoden wird entweder das genetische Material eines bestehenden Organismus so verändert, wie es unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht vorkommt, sodass das GenTG Anwendung findet, oder es werden Methoden zur Generierung von Protozellen entwickelt, auf die das GenTG keine Anwendung findet (siehe Abschnitt 2.4). Die beschriebene *in silico*-Methode beinhaltet keinen Umgang mit einem Organismus, sodass das GenTG keine Anwendung findet und keine Gefahr für die biologische Sicherheit entsteht.

3 Literatur

1. **Fredens J, Wang K, La Torre D de, Funke LFH, Robertson WE, Christova Y, Chia T, Schmied WH, Dunkelmann DL, Beránek V, Uttamapinant C, Llamazares AG, Elliott TS, Chin JW** (2019). Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome. *Nature* **569**(7757):514–8.
2. **Lin KN, Volkel K, Tuck JM, Keung AJ** (2020). Dynamic and scalable DNA-based information storage. *Nat Commun* **11**(1):2981.
3. **Chow K-HK, Budde MW, Granados AA, Cabrera M, Yoon S, Cho S, Huang T-H, Koulena N, Frieda KL, Cai L, Lois C, Elowitz MB** (2021). Imaging cell lineage with a synthetic digital recording system. *Science* **372**(6538).
4. **Wang K, La Torre D de, Robertson WE, Chin JW** (2019). Programmed chromosome fission and fusion enable precise large-scale genome rearrangement and assembly. *Science* **365**(6456):922–6.
5. **Kotopka BJ, Smolke CD** (2020). Model-driven generation of artificial yeast promoters. *Nat Commun* **11**(1):2113.
6. **Pandi A, Koch M, Voyvodic PL, Soudier P, Bonnet J, Kushwaha M, Faulon J-L** (2019). Metabolic perceptrons for neural computing in biological systems. *Nat Commun* **10**(1):3880.
7. **Chen Z, Kibler RD, Hunt A, Busch F, Pearl J, Jia M, VanAernum ZL, Wicky BIM, Dods G, Liao H, Wilken MS, Ciarlo C, Green S, El-Samad H, Stamatoyannopoulos J, Wysocki VH, Jewett MC, Boyken SE, Baker D** (2020). De novo design of protein logic gates. *Science* **368**(6486):78–84.
8. **Segall-Shapiro TH, Sontag ED, Voigt CA** (2018). Engineered promoters enable constant gene expression at any copy number in bacteria. *Nat Biotechnol* **36**(4):352–8.
9. **Frei T, Cella F, Tedeschi F, Gutiérrez J, Stan G-B, Khammash M, Siciliano V** (2020). Characterization and mitigation of gene expression burden in mammalian cells. *Nat Commun* **11**(1):4641.

10. **Krawczyk K, Xue S, Buchmann P, Charpin-El-Hamri G, Saxena P, Hussherr M-D, Shao J, Ye H, Xie M, Fussenegger M** (2020). Electrogenetic cellular insulin release for real-time glycemic control in type 1 diabetic mice. *Science* **368**(6494):993–1001.
11. **Aratboni HA, Rafiei N, Khorashad LK, Lerma-Escalera AI, Balderas-Cisneros FdJ, Liu Z, Alemzadeh A, Shaji S, Morones-Ramírez JR** (2021). LED control of gene expression in a nanobiosystem composed of metallic nanoparticles and a genetically modified *E. coli* strain. *J Nanobiotechnology* **19**(1):190.
12. **Hörner M, Jerez-Longres C, Hudek A, Hook S, Yousefi OS, Schamel WWA, Hörner C, Zurbriggen MD, Ye H, Wagner HJ, Weber W** (2021). Spatiotemporally confined red light-controlled gene delivery at single-cell resolution using adeno-associated viral vectors. *Sci Adv* **7**(25).
13. **Nakanishi H, Yoshii T, Kawasaki S, Hayashi K, Tsutsui K, Oki C, Tsukiji S, Saito H** (2021). Light-controllable RNA-protein devices for translational regulation of synthetic mRNAs in mammalian cells. *Cell Chem Biol* **28**(5):662-674.e5.
14. **Chung HK, Zou X, Bajar BT, Brand VR, Huo Y, Alcudia JF, Ferrell JE, Lin MZ** (2019). A compact synthetic pathway rewires cancer signaling to therapeutic effector release. *Science* **364**(6439).
15. **Huang H, Liu Y, Liao W, Cao Y, Liu Q, Guo Y, Lu Y, Xie Z** (2019). Oncolytic adenovirus programmed by synthetic gene circuit for cancer immunotherapy. *Nat Commun* **10**(1):4801.
16. **Lajoie MJ, Boyken SE, Salter AI, Bruffey J, Rajan A, Langan RA, Olshefsky A, Muhunthan V, Bick MJ, Gewe M, Quijano-Rubio A, Johnson J, Lenz G, Nguyen A, Pun S, Correnti CE, Riddell SR, Baker D** (2020). Designed protein logic to target cells with precise combinations of surface antigens. *Science* **369**(6511):1637–43.
17. **Williams JZ, Allen GM, Shah D, Sterin IS, Kim KH, Garcia VP, Shavey GE, Yu W, Puig-Saus C, Tsoi J, Ribas A, Roybal KT, Lim WA** (2020). Precise T cell recognition programs designed by transcriptionally linking multiple receptors. *Science* **370**(6520):1099–104.
18. **Hernandez-Lopez RA, Yu W, Cabral KA, Creasey OA, Lopez Pazmino MDP, Tonai Y, Guzman A de, Mäkelä A, Saksela K, Gartner ZJ, Lim WA** (2021). T cell circuits that sense antigen density with an ultrasensitive threshold. *Science* **371**(6534):1166–71.
19. **Nguyen PQ, Soenksen LR, Donghia NM, Angenent-Mari NM, Puig H de, Huang A, Lee R, Slomovic S, Galbersanini T, Lansberry G, Sallum HM, Zhao EM, Niemi JB, Collins JJ** (2021). Wearable materials with embedded synthetic biology sensors for biomolecule detection. *Nat Biotechnol* **39**(11):1366–74.
20. **Gleizer S, Ben-Nissan R, Bar-On YM, Antonovsky N, Noor E, Zohar Y, Jona G, Krieger E, Shamshoum M, Bar-Even A, Milo R** (2019). Conversion of *Escherichia coli* to Generate All Biomass Carbon from CO₂. *Cell* **179**(6):1255-1263.e12.
21. **South PF, Cavanagh AP, Liu HW, Ort DR** (2019). Synthetic glycolate metabolism pathways stimulate crop growth and productivity in the field. *Science* **363**(6422).
22. **Miller TE, Beneyton T, Schwander T, Diehl C, Girault M, McLean R, Chotel T, Claus P, Cortina NS, Baret J-C, Erb TJ** (2020). Light-powered CO₂ fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts. *Science* **368**(6491):649–54.
23. **Scheffen M, Marchal DG, Beneyton T, Schuller SK, Klose M, Diehl C, Lehmann J, Pfister P, Carrillo M, He H, Aslan S, Cortina NS, Claus P, Bollschweiler D, Baret J-C, Schuller JM, Zarzycki J, Bar-Even A, Erb TJ** (2021). A new-to-nature carboxylation module to improve natural and synthetic CO₂ fixation. *Nat Catal* **4**(2):105–15.
24. **Schwander T, Schada von Borzyskowski L, Burgener S, Cortina NS, Erb TJ** (2016). A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide in vitro. *Science* **354**(6314):900–4.
25. **Luo X, Reiter MA, d'Espaux L, Wong J, Denby CM, Lechner A, Zhang Y, Grzybowski AT, Harth S, Lin W, Lee H, Yu C, Shin J, Deng K, Benites VT, Wang G, Baidoo EEK, Chen Y, Dev I, Petzold CJ, Keasling JD** (2019). Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature* **567**(7746):123–6.
26. **Sadler JC, Wallace S** (2021). Microbial synthesis of vanillin from waste poly(ethylene terephthalate). *Green Chem* **23**(13):4665–72.

27. **Reifenrath M, Oreb M, Boles E, Tripp J** (2020). Artificial ER-Derived Vesicles as Synthetic Organelles for in Vivo Compartmentalization of Biochemical Pathways. *ACS Synth Biol* **9**(11):2909–16.
28. **Shao Y, Lu N, Wu Z, Cai C, Wang S, Zhang L-L, Zhou F, Xiao S, Liu L, Zeng X, Zheng H, Yang C, Zhao Z, Zhao G, Zhou J-Q, Xue X, Qin Z** (2018). Creating a functional single-chromosome yeast. *Nature* **560**(7718):331–5.
29. **Luo Z, Yu K, Xie S, Monti M, Schindler D, Fang Y, Zhao S, Liang Z, Jiang S, Luan M, Xiao C, Cai Y, Dai J** (2021). Compacting a synthetic yeast chromosome arm. *Genome Biol* **22**(1):5.
30. **Venetz JE, Del Medico L, Wöflle A, Schächle P, Bucher Y, Appert D, Tschan F, Flores-Tinoco CE, van Kooten M, Guennoun R, Deutsch S, Christen M, Christen B** (2019). Chemical synthesis rewriting of a bacterial genome to achieve design flexibility and biological functionality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**(16):8070–9.
31. **Niederholtmeyer H, Chaggan C, Devaraj NK** (2018). Communication and quorum sensing in non-living mimics of eukaryotic cells. *Nat Commun* **9**(1):5027.
32. **Litschel T, Kelley CF, Holz D, Adeli Koudehi M, Vogel SK, Burbaum L, Mizuno N, Vavylonis D, Schwille P** (2021). Reconstitution of contractile actomyosin rings in vesicles. *Nat Commun* **12**(1):2254.
33. **Ghosh S, Mohajerani F, Son S, Velegol D, Butler PJ, Sen A** (2019). Motility of Enzyme-Powered Vesicles. *Nano Lett* **19**(9):6019–26.
34. **Ahmad R, Kleineberg C, Nasirimarekani V, Su Y-J, Goli Pozveh S, Bae A, Sundmacher K, Bodenschatz E, Guido I, Vidaković-Koch T, Gholami A** (2021). Light-Powered Reactivation of Flagella and Contraction of Microtubule Networks: Toward Building an Artificial Cell. *ACS Synth Biol* **10**(6):1490–504.
35. **Berhanu S, Ueda T, Kuruma Y** (2019). Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis. *Nat Commun* **10**(1):1325.
36. **Biner O, Fedor JG, Yin Z, Hirst J** (2020). Bottom-Up Construction of a Minimal System for Cellular Respiration and Energy Regeneration. *ACS Synth Biol* **9**(6):1450–9.
37. **Joesaar A, Yang S, Bögels B, van der Linden A, Pieters P, Kumar BVVSP, Dalchau N, Phillips A, Mann S, Greef TFA de** (2019). DNA-based communication in populations of synthetic protocells. *Nat Nanotechnol* **14**(4):369–78.
38. **Yang S, Pieters PA, Joesaar A, Bögels BWA, Brouwers R, Myrgorodska I, Mann S, Greef TFA de** (2020). Light-Activated Signaling in DNA-Encoded Sender-Receiver Architectures. *ACS Nano* **14**(11):15992–6002.
39. **Buddingh' BC, Elzinga J, van Hest JCM** (2020). Intercellular communication between artificial cells by allosteric amplification of a molecular signal. *Nat Commun* **11**(1):1652.
40. **Calles J, Justice I, Brinkley D, Garcia A, Endy D** (2019). Fail-safe genetic codes designed to intrinsically contain engineered organisms. *Nucleic Acids Res* **47**(19):10439–51.
41. **Hoshika S, Leal NA, Kim M-J, Kim M-S, Karalkar NB, Kim H-J, Bates AM, Watkins NE, SantaLucia HA, Meyer AJ, DasGupta S, Piccirilli JA, Ellington AD, SantaLucia J, Georgiadis MM, Benner SA** (2019). Hachimoji DNA and RNA: A genetic system with eight building blocks. *Science* **363**(6429):884–7.
42. **Flamme M, Röthlisberger P, Levi-Acobas F, Chawla M, Oliva R, Cavallo L, Gasser G, Marlière P, Herdewijn P, Hollenstein M** (2020). Enzymatic Formation of an Artificial Base Pair Using a Modified Purine Nucleoside Triphosphate. *ACS Chem Biol* **15**(11):2872–84.
43. **Robertson WE, Funke LFH, La Torre D de, Fredens J, Elliott TS, Spinck M, Christova Y, Cervettini D, Böge FL, Liu KC, Buse S, Maslen S, Salmond GPC, Chin JW** (2021). Sense codon reassignment enables viral resistance and encoded polymer synthesis. *Science* **372**(6546):1057–62.
44. **DeBenedictis EA, Carver GD, Chung CZ, Söll D, Badran AH** (2021). Multiplex suppression of four quadruplet codons via tRNA directed evolution. *Nat Commun* **12**(1):5706.

-
45. **Koh M, Yao A, Gleason PR, Mills JH, Schultz PG** (2019). A General Strategy for Engineering Noncanonical Amino Acid Dependent Bacterial Growth. *J Am Chem Soc* **141**(41):16213–6.
 46. **Chen Y, Tang J, Wang L, Tian Z, Cardenas A, Fang X, Chatterjee A, Xiao H** (2020). Creation of Bacterial cells with 5-Hydroxytryptophan as a 21st Amino Acid Building Block. *Chem* **6**(10):2717–27.
 47. **Bourgeois L, Pyne ME, Martin VJJ** (2018). A Highly Characterized Synthetic Landing Pad System for Precise Multicopy Gene Integration in Yeast. *ACS Synth Biol* **7**(11):2675–85.
 48. **Hamashima K, Soong YT, Matsunaga K-I, Kimoto M, Hirao I** (2019). DNA Sequencing Method Including Unnatural Bases for DNA Aptamer Generation by Genetic Alphabet Expansion. *ACS Synth Biol* **8**(6):1401–10.
 49. **Koch J, Gantenbein S, Masania K, Stark WJ, Erlich Y, Grass RN** (2020). A DNA-of-things storage architecture to create materials with embedded memory. *Nat Biotechnol* **38**(1):39–43.
 50. **Zhang Y, Wang F, Chao J, Xie M, Liu H, Pan M, Kopperger E, Liu X, Li Q, Shi J, Wang L, Hu J, Wang L, Simmel FC, Fan C** (2019). DNA origami cryptography for secure communication. *Nat Commun* **10**(1):5469.
 51. **Li Q, Li S, Zhang X, Xu W, Han X** (2020). Programmed magnetic manipulation of vesicles into spatially coded prototissue architectures arrays. *Nat Commun* **11**(1):232.
 52. **Dreher Y, Jahnke K, Bobkova E, Spatz JP, Göpfrich K** (2021). Division and Regrowth of Phase-Separated Giant Unilamellar Vesicles*. *Angew Chem Int Ed Engl* **60**(19):10661–9.
 53. **Ip T, Li Q, Brooks N, Elani Y** (2021). Manufacture of Multilayered Artificial Cell Membranes through Sequential Bilayer Deposition on Emulsion Templates. *ChemBiochem* **22**(13):2275–81.
 54. **Zhang M, Zundel Z, Myers CJ** (2019). SBOLEplorer: Data Infrastructure and Data Mining for Genetic Design Repositories. *ACS Synth Biol* **8**(10):2287–94.