

Hans-Werner Denker

EMBRYONEN, EMBRYOIDE, GASTRULOIDE ...

Ethische Aspekte zur Selbstorganisation und zum Engineering von Stammzellkolonien und Embryonen

ABSTRACT

Die Stammzellforschung ist im Begriff, einen neuen Fokus zu entwickeln, der, ausgehend vom Phänomen der Selbstorganisation von Organoiden, nun ein Embryo-Engineering ins Visier nimmt. Im Zentrum steht der Befund, dass Stammzellen eine Tendenz haben, autonom Musterbildungsprozesse in Gang zu setzen, die in einfachen In-Vitro-Systemen zu bemerkenswerten Morphogeneseleistungen führen können: So können Organoide aus pluripotenten und, begrenzt, auch aus multipotenten Stammzellen hergestellt werden, Embryoide verschiedener Komplexitätsgrade (u. a. »Gastruloide«) aus pluripotenten Stammzellen.

Der vorliegende Beitrag diskutiert aktuelle Ergebnisse dieser Forschungsrichtung unter dem Aspekt, dass die jetzt beschriebenen komplexeren Embryoide Stadien erreichen, in denen die bekannten Prozesse der Individuation ablaufen (Primitivstreifen als Voraussetzung für die Bildung der Körpergrundgestalt; organismische Ganzheit). Durch ein gezieltes »Embryo-Engineering« können besonders eindrucksvolle Entwicklungsleistungen solcher Konstrukte erreicht werden. Ethisch höchst problematisch ist es, derartige Forschungen unter Einsatz menschlicher Stammzellen durchzuführen.

Wie die aktuellen Untersuchungen zeigen, spielen im Rahmen von Embryogenesevorgängen in Stammzellderivaten in vitro Selbstorganisationsprozesse eine wesentliche Rolle. Daher gewinnt das ethische Potentialitätsargument Aktualität und eine herausragende Bedeutung, da sich zeigt, dass die de-novo-Entstehung von entwicklungsbiologischer Autonomie, einer embryonalen Form von organischer Ganzheit, in Gruppen von Stammzellen erfolgen kann. Der vorliegende Beitrag diskutiert insbesondere die Rolle von Selbstorganisation (entwicklungsbiologischer Autonomie) in Stammzellkolonien in Relation zur manipulierten Morphogenese in synthetischen Embryonen (Embryo-Engineering). Im Hinblick auf den Umgang mit menschlichen pluripotenten Stammzellen muss davor gewarnt werden, die beschriebenen neuen technischen Möglichkeiten zum Argument dafür zu machen, Forschung an menschlichen Embryonen und Embryoiden zu liberalisieren und die Grenzsetzung für Forschung an menschlichen Embryonen im Primitivstreifenstadium (14-Tage-Regel), die bisher sogar in Ländern mit relativ liberaler Gesetzgebung gilt, aufzugeben. Diese Forschungen sollten sich auf Tiermodelle beschränken.

1. DER BEGINN DER EXISTENZ DES MENSCHEN ALS INDIVIDUUM: FRAGEN AN DIE ENTWICKLUNGSBIOLOGIE

Die Entwicklungsbiologie versucht zu verstehen, wie Organismen in ihrer Individualentwicklung (Ontogenese) entstehen; dazu untersucht sie diese Vorgänge mit experimentell-kausalanalytischem Ansatz, wie es sich, heutigem Verständnis entsprechend, für eine Naturwissenschaft gehört. So ein Vorhaben mag vielleicht als kühn gelten, vor allem mit Blick auf den Menschen. Die Entwicklungsbiologie wagt sich zwar beileibe nicht so weit vor, die Ontogenese des Menschen in allen Aspekten seiner existentiellen Ganzheit, als geistiges und soziales Wesen, begreifen zu wollen; es geht der naturwissenschaftlichen Entwicklungsbiologie nur um den somatischen Aspekt, die Entstehung eines funktionsfähigen Körpers, d. h. um die Entstehung des Organismus. Die Bedingungen für das Aufkeimen einer so verstandenen organismischen Ganzheit, also eines eigenständig existierenden und funktionierenden Körpers, zu durchleuchten, ist aber per se schon ein sehr anspruchvolles Vorhaben, und auch die moderne Biologie mit all ihren aufwändigen Untersuchungsverfahren ist weit davon entfernt, dieses Ziel erreicht zu haben. Allerdings gibt es neuerdings spektakuläre Befunde aus dem Bereich der experimentellen Embryologie und der Stammzellforschung, die Anlass geben, über die Bedingungen der Entstehung einer organismischen Ganzheit beim Säugetier einschließlich des Menschen und, davon ausgehend, über ethische Implikationen neu nachzudenken. Das soll Thema dieses Beitrags sein.

Mit dem Aufkommen des experimentellen Ansatzes in den Naturwissenschaften hat sich bekanntlich gezeigt, dass es Urzeugung von Zellen in unserer Welt nicht (mehr) gibt (»*Omne vivum ex vivo*«) und dass vielzellige Organismen bei den allermeisten Tierarten aus Eizellen hervorgehen (»*Omne vivum ex ovo*«; Francesco Redi (1626–1697)). Dagegen ist eine Entstehung durch Knospung/Sprossung aus existierenden Organismen (d. h. ohne Eizelle) zwar als Alternativweg durchaus auch bekannt, aber im Tierreich selten zu finden. Seit Karl Ernst von Baer 1827, also relativ spät in der Wissenschaftsgeschichte, die Säugetiereizelle entdeckte, wird die Frage nach der biologischen Grundlage der Individualentwicklung beim Säugetier einschließlich des Menschen in aller Regel nur als die Entwicklung aus der befruchteten Eizelle, der Zygote, diskutiert, und es geht dann darum zu verstehen, wie aus dieser einen Zelle schließlich der ausdifferenzierte, vielzellige menschliche Organismus wird. Was den Startpunkt anbelangt, so impliziert dies die Frage: Haben wir es unmittelbar nach der Befruchtung, also schon im Stadium der Zygote, mit einem Organismus in anderer Form zu tun, ist die befruchtete Eizelle schon *der* werdende Organismus, der schließlich geboren werden wird, *in nuce* sozusagen, oder ist sie noch etwas ganz Anderes, Vor-Individuelles?

Die Zygote teilt sich bekanntlich in eine Vielzahl von Zellen, und diese differenzieren sich, in sehr geregelter Weise, zu den Konstituenten all der vielen Organe des Körpers. Wesentlich ist, dass dabei ein erstaunlicher Grad von *räumlicher Ordnung* entsteht, und diese räumliche Ordnung ist von zentraler Bedeutung für das spätere sinnvolle Zusammenwirken der Gewebe und Organe, d. h. für das Entstehen dessen, was wir als adulten Organismus kennen. Die Embryologie hat uns gelehrt, wie diese Vorgänge in gesetzmäßiger Weise ablaufen. Aber welche Bedeutung kommt den einzelnen Abläufen zu, und welche Dignität jeder der einzelnen Stufen in diesem Entstehungsprozess, soweit es denn wirklich Stufen in dem Kontinuum der Entwicklung gibt? Entsteht an irgendeinem Punkt im Verlauf der Entwicklung dabei eine völlig neue Qualität, und wenn, wie ist so ein Quantensprung in Relation zu dem zu sehen, was die Zygote bereits war? Und welche Relevanz sollen wir diesem Sachverhalt dann beimessen für den Umgang mit Embryonen und mit embryonalen Stammzellen?

Präformismus und Epigenese, diese Begriffe apostrophieren klassische gedankliche Ansätze dafür, Entwicklungsvorgänge zu erklären. Wie viel an Strukturinformation ist schon von Anbeginn der Entwicklung an vorgegeben, wie viel entwickelt sich völlig neu, in Abhängigkeit von äußeren Rahmenbedingungen? Die beiden Schlagwörter sind als Werkzeug in gewisser Weise hilfreich, nur sind sie Extremformulierungen, die je für sich die Wirklichkeit nicht adäquat abbilden, das wissen wir inzwischen durch experimentelle Befunde an verschiedenen Organismen recht gut (vgl. Lehrbücher der Entwicklungsbiologie, z. B. Gilbert 2014). Entwicklungsprozesse können (in verschiedenen Organismen und in den einzelnen Entwicklungsstadien) entweder von (meist zytoplasmatischen) morphogenetischen Determinanten abhängen (»Mosaiktyp«, »autonomous specification« (Gilbert 2014)), die schon die Zygote mitbringt, oder von Zell-Zell-Interaktionen (»Regulationstyp«, »conditional specification«, abhängige Entwicklung), die natürlich erst dann beginnen können, wenn der Embryo schon aus einer Mehrzahl von Zellen besteht. Verschiedene Teilprozesse der Entwicklung kombinieren diese zwei Prinzipien in verschiedener Weise, und dies wiederum bei den einzelnen Tierarten unterschiedlich. In allen Fällen, auch beim Regulationstyp (Säugetier-Embryonen), erfordert die Entstehung von geordneten Zellverbänden und Organen jedoch Richtungs-(Achsen-) Informationen, die für die Entstehung von räumlicher Ordnung entscheidend sind. Wenn sie fehlen oder in ihrer Funktion gestört sind, entsteht ein chaotisches Durcheinander der Gewebe, ein Tumor (Teratom). Diese wichtigen strukturellen Vorinformationen können aber relativ einfache Asymmetrien sein, die die spätere Gestalt dem unbedarften Auge noch nicht anzeigen, sondern nur dem entwicklungsbiologischen Experiment zugänglich sind. Sie sind nicht einfach als eine 1:1 umsetzbare Planvorlage (»Blueprint«) für die endgültige

Architektur des Organismus zu sehen, sondern sie bieten Grundsteine dafür, dass überhaupt eine Körper-Architektur entstehen kann.

Eine wichtige Erkenntnis der Entwicklungsbiologie ist, dass frühe Entwicklungsstadien, schon von der Zygote an, ganzheitliche Reaktionsweisen zeigen, d. h. als eine Art Organismus reagieren. Eine aphoristische Formulierung von Friedrich Seidel (Seidel 1960), die sich auf Karl Ernst von Baer beruft, versucht, diese Aspekte zu akzentuieren, indem sie den Gestaltbegriff in die Diskussion einbringt: »Entwicklung ist Umbildung von einer Gestalt zur anderen.« Das ist provokant, denn es vergleicht die Entwicklung des ausdifferenzierten, vielzelligen Organismus aus der Zygote mit einer Art Metamorphose, wie wir sie im Tierreich von niederen Tieren kennen. Liegt wirklich in der menschlichen Zygote, mit ihrem Minimum an Form und ihrem Maximum an Potenz, schon ein funktionelles Ganzes im Sinn eines Menschleins *in nuce* vor? Gibt die Zygote schon zum Beispiel Achseninformationen vor? Oder ist, ganz im Gegenteil, jede Strukturierung später einsetzenden Vorgängen vorbehalten und zum Beispiel die Morula immer noch nur ein ungeordneter Zellhaufen, etwa wie eine Stammzellkolonie, also ganz ohne ordnende Richtungsvorgaben, wie manche Autoren behaupten? Oder, wenn wir die moderne genetisch-/epigenetische Sprechweise bemühen: Wie sollen wir es werten, dass die Zygote zweifellos schon die ganze einmalige genetische Information des zukünftigen Individuums besitzt, sie ja aber bekanntlich noch nicht ganz exprimiert, beileibe nicht ganz, sondern dass noch sehr viele epigenetische Zusatzinformationen den funktionellen Status des Genoms in den vielen Tochterzellen modifizieren werden, bis alle Zellen des Organismus ausgereift sind? Und wie wird dabei sichergestellt, dass dies in der prospektiv richtigen Anordnung dieser verschiedenen Zelltypen geschieht, entsprechend dem *Körper-Grundplan* (»*basic body plan*«, *Körpergrundgestalt*)? Eine Gretchenfrage der Entwicklungsbiologie lautet in diesem Kontext: Müssen wir davon ausgehen, dass von außerhalb des Zellbestands des zukünftigen Individuums Zusatzinformationen hinzukommen müssen, also *essentiell* sind, damit überhaupt ein Organismus entstehen kann (und nicht ein Teratom), etwa Informationen, die vom Uterus bei der Einnistung geliefert werden könnten? Wie *autonom* ist also, entwicklungsbiologisch gesehen, die Zygote, oder ab wann ist es der Embryo, d. h. wann beginnt die Existenz als sich zwar noch entwickelnder, aber bezüglich der morphogenetischen Potenz bereits eigenständiger Organismus, bei Säugetieren einschließlich des Menschen?

Mehr praxisnah formuliert: Sind überhaupt auch noch andere Entstehungsmöglichkeiten für einen Säugetierorganismus denkbar, eine Entwicklung, die nicht mit einer Zygote beginnt, sondern zum Beispiel von Stammzellen ihren Ausgang nimmt? Also etwas, was der eingangs angesprochenen Sprossung bei niederen Tieren vergleichbar ist, aber nun Menschen-gemacht

möglich wird, selbst beim Säugetier (einschließlich des Menschen), in vitro? In der Tat, die schnell voranschreitende Stammzellforschung zeigt neuerdings immer deutlicher, dass dem prinzipiell so ist, und dass man »nur noch« die verschiedenen Bedingungen diskutieren muss, unter denen dies geschehen kann. Wir müssen demnach unser traditionelles Bild von der Einzigartigkeit der Entstehungsweise eines neuen menschlichen Organismus aus der Zygote hinterfragen und offenbar zumindest erweitern.

2. ASSISTIERTE MORPHOGENESE, SELBSTORGANISATION UND EMBRYO-ENGINEERING: EIN NEUER FOKUS DER ENTWICKLUNGSBIOLOGISCHEN FORSCHUNG

Die Diskussionen um ethische Aspekte der Stammzellforschung hatten sich in den ersten Jahren, nachdem die Erzeugung von menschlichen embryonalen Stammzellen (hESC) beschrieben worden war (Thomson et al. 1998), zunächst auf die Problematik des Opfern menschlicher Embryonen zum Zweck der Gewinnung dieser Stammzellen konzentriert. Zwar war schon damals darauf hingewiesen worden, dass auch der *Umgang* mit hESC *per se* ethische Probleme aufwirft, nämlich wegen der Potentialität dieser besonderen Zellen (Denker 1999), aber solche Hinweise wurden, obwohl in den Folgejahren in anderen Publikationen häufig wiederholt, von den meisten Stammzellforschern und von der Forschungspolitik als Marginalien betrachtet. Jetzt muss sich diese Einstellung aufgrund einer zunehmenden Zahl von Befunden der aktuellen Stammzellforschung und der experimentellen Embryologie zwangsläufig ändern. Im Vordergrund stehen dabei Befunde aus zwei Forschungsbereichen: 1.) Klonen durch Tetraploide Komplementierung; 2.) Selbstorganisation in vitro und Embryo-Engineering.

2.1 TETRAPLOIDE KOMPLEMENTIERUNG (TK)

Die TK ist eine Methodik, die entwickelt worden ist, um im Tierversuch (Maus) voll lebens- und fortpflanzungsfähige Organismen aus ESC zu erzeugen (zur Methodik s. Denker 2002). Dieses Verfahren bedient sich des Einsatzes von embryonalen Hilfszellen (Blastomeren oder Hilfsblastozysten), die durch eine Vorbehandlung dazu gebracht worden sind, dass sie sozusagen nur noch ein Gerüst (Achseninformation) für die geordnete Morphogenese liefern, sich aber nicht direkt an der Bildung eines Embryonalkörpers beteiligen (der in diesem Fall vollständig aus den eingesetzten Stammzellen entsteht). Schon sehr früh ist darauf hingewiesen worden, dass die Fähigkeit zur assistierten Morphogenese, die sich hier zeigt, eine besondere Eigenschaft von pluripotenten Stammzellen (PPSC, d. h. ESC und induzierte pluripo-

tente Stammzellen, iPSC) ist, dass somatische (adulte) Stammzellen diese Eigenschaft nicht haben, und dass diese Besonderheit eine große ethische Problematik für den Umgang mit menschlichen PPSC mit sich bringt: Selbst wenn beim Menschen eine Anwendung der TK zur Erzeugung lebensfähiger Embryonen aus Stammzellen nicht intendiert werden sollte und obwohl gesetzliche Bestimmungen (Embryonenschutzgesetz) der Anwendung dieses Verfahrens (als einer besonderen Form des Klonens) bei menschlichen Zellen in unserem Land im Weg stehen, so zeigt sich an diesem Beispiel auf jeden Fall, dass man für den Umgang mit PPSC besondere Regeln benötigt, die die prinzipielle Existenz dieses Alternativwegs für die Entstehung eines Individuums berücksichtigen (Denker 1999; Denker 2006). Die Problematik, die die TK für den Umgang mit menschlichen PPSC mit sich bringt, zeigt sich zum Beispiel auch recht deutlich in Fragen der Patentierung (Denker 2004a; Denker 2006; Denker 2008). Als Methoden verfügbar wurden, wie man PPSC auf alternativen Wegen, unter Vermeidung des Embryonen-Verbrauchs, erzeugen kann (iPSC), wurde deutlich, dass zumindest bei der Maus eine TK auch mit diesen iPSC möglich ist. Damit war eigentlich klar, dass man über Regelungen nachdenken muss, die explizit die Möglichkeit des Klonens aus iPSC berücksichtigen, und dass diese Regelungen eine derartige Verwendung von menschlichen iPSC untersagen sollten, wenn man wirklich vermeiden will, dass das Klonverbot unterminiert wird (Denker 2009a; Lo et al. 2010).

Es ist erstaunlich, dass es so lange gedauert hat, bis sich dieser Aspekt auch in einschlägigen Forschungsprojekten, die sich mit juristischen und ethischen Aspekten der Embryonen- und Stammzellforschung befassen, niederzuschlagen beginnt, denn eigentlich ist die Methodik der TK schon seit Beginn der 1990er Jahre bekannt (Nagy et al. 1990; Nagy 1993), und es ist auch schon früh auf ihre Implikationen im Hinblick auf hESC hingewiesen worden (Denker 1999 und Folgejahre). Jetzt liegen allerdings erste Stellungnahmen aus einem solchen Ethikprojekt vor (Heinemann et al. 2016). Dabei geht es durchaus nicht nur um die TK, sondern auch um andere Verfahren, die es gestatten, aus Oozyten oder Stammzellen Entitäten zu erzeugen, die eine (unter Umständen vollständige) Entwicklungsfähigkeit besitzen (Totipotenz; zur konfusen Terminologie siehe Denker 2014), also um verschiedene Verfahren des Klonens oder des Engineerings von Organismen oder Organismus-ähnlichen Gebilden. Die besagte Arbeitsgruppe um Heinemann, Dederer und Cantz ist in ihrem Forschungsprojekt zu dem Schluss gekommen, dass Verfahren, die wie die TK zur artifiziiellen Erzeugung totipotenter Entitäten geeignet sind, bei der Verwendung menschlicher PPSC tatsächlich erhebliche ethische Probleme aufwerfen. Um dennoch möglichst weite Handlungsspielräume zu eröffnen, schlägt nun die besagte Arbeitsgruppe vor, eine Abstufung der Schutzwürdigkeit dieser Entitäten vorzunehmen, und zwar nicht nach Maßgabe der erreichbaren oder erreichten Entwicklungsfähigkeiten, sondern

je nach Grad der Artifizialität der Entstehungsbedingungen dieser Entitäten. In Abhängigkeit von diesem Artifizialitätsgrad, den man für jede Entität aus einer von den Autoren vorgeschlagenen Matrix entnehmen kann, kann dann der Umgang mit totipotenten Entitäten mehr oder weniger großzügig gestattet werden, also ohne auf die Potenz dieser Entitäten Rücksicht zu nehmen.

Mir scheint ein solcher Ansatz zu kurz zu greifen, weil er ohne eine überzeugende Begründung den Aspekt der Entwicklungsbefähigung hinter den der Entstehungsweise dieser Entitäten hinsichtlich der zu ziehenden ethischen Konsequenzen zurückstellt. Er scheint einen im Ansatz sehr schlichten Utilitarismus zu bedienen. Die Bedeutung des Gesichtspunkts der entwicklungsbiologischen Autonomie für eine naturwissenschaftlich begründete Bioethik des Umgangs mit embryonalen Entitäten verkennt er. Auch der Menschenwürdebegriff gründet ja in einer Reflexion über die Autonomie des Individuums, so dass die Ontogenese der organismischen Autonomie des Individuums nicht außer Betracht bleiben darf. Die TK ist allerdings nicht geeignet als Argument im Rahmen der Würdigung der Rolle der entwicklungsbiologischen Autonomie, denn was sie demonstriert, ist ja lediglich eine Art von Plastizität, eine Entwicklungsfähigkeit in Abhängigkeit von Hilfszellen, die offenbar wesentliche strukturierende Informationen liefern.¹ Ich wende mich deshalb in den folgenden Ausführungen schwerpunktmäßig dem Gesichtspunkt der Autonomie und biologischen Befunden zur Selbstdifferenzierung zu und diskutiere sie in Relation zur gezielten Herstellung embryonaler Konstrukte. Im Hintergrund werden Fragen nach Natürlichkeit, Künstlichkeit und Machbarkeit stehen.

2.2 SELBSTORGANISATION IN VITRO UND EMBRYO-ENGINEERING

2.2.1 *Organoide*

Ein neuer Schwerpunkt der Stammzellforschung konzentriert sich auf die Bildung von »*Organoiden*«, die sich in vitro in Kulturen von PPSC oder auch multipotenten Stammzellen unter bestimmten Bedingungen bilden können.

¹ Die TK spielt eine wesentliche Rolle in einer kürzlich vorgetragenen grundsätzlichen Kritik am Potentialitätsargument (Stier/Schöne-Seifert 2013), auf die ich im Abschnitt 3.1 näher eingehe. Ich möchte betonen, dass ich selbst die TK nie als Argument für eine autonome Entwicklungsbefähigung (Totipotenz im engeren Sinn) angesehen oder dargestellt habe und das auch hier nicht tue. Die TK zeigt nur eine Entwicklungsfähigkeit in Abhängigkeit von Hilfszellen an. Sie demonstriert insofern nur eine passive, keine aktive Potenz. Dennoch wirft sie ethische Fragen auf, die in den bestehenden gesetzlichen Regelungen nicht ausreichend berücksichtigt sind, und sie zeigt deutlich Grenzen für den ethisch unbedenklichen Umgang mit hPPSC auf.

Es handelt sich dabei um z. T. sehr komplex aufgebaute, dreidimensionale Strukturen, die unterschiedlich getreu den Aufbau verschiedener Organe widerspiegeln. Hoffnung scheint berechtigt, dass (1.) solche Untersuchungen erheblich helfen können, die Grundprozesse der Organogenese experimentell zu untersuchen, (2.) dass sie als Modellsysteme zur Untersuchung der Pathogenese verschiedener Erkrankungen und zur Entwicklung spezifischer (auch patientenspezifischer) Therapieformen dienen können, und (3.) dass die so *in vitro* erzeugten Organoide zukünftig auch in der medizinischen Gewebe- und Organersatztherapie Einsatz finden können (Willyard 2015; Clevers 2016).

Ein für unsere Überlegungen interessantes Phänomen ist, dass in dieser Literatur in der letzten Zeit häufig der Begriff »*Selbstorganisation*« auftaucht. Dieser Terminus beschreibt Prozesse, die dazu führen, dass sich in Gruppen von zunächst ungeordnet wachsenden Zellen spontan komplexe Gewebsstrukturen bilden, ohne dass diese Morphogenese von spezifischen instruktiven Signalen von außen, vonseiten anderer Zellen oder Gewebe, abhinge. Der Begriff *Selbstorganisation* ist zwar schon seit langer Zeit aus der klassischen entwicklungsbiologischen Literatur bekannt, wurde aber in der Vergangenheit selten benutzt. Dass er nun plötzlich so häufig in der Literatur auftaucht, könnte zu der Vermutung Anlass geben, dass man inzwischen so viel über die zellulären und molekularbiologischen Mechanismen der *Selbstorganisation* weiß, dass das Phänomen nun auf breiter Basis diskutiert werden kann. Dies ist aber durchaus nicht der Fall. Der Grund für das gewachsene Interesse ist ein anderer, rein praktischer: Es ist in den letzten Jahren ein Arsenal von Methoden entwickelt worden, die es gestatten, aus Stammzellen die oben genannten Organoide herzustellen. Sogar die Industrie hat hier einen Markt entdeckt und bietet inzwischen Kits an, die die routinemäßige Herstellung solcher Organoide erleichtern sollen. Wir können auch hier wieder einmal mehr, als wir verstehen. In der Tat findet aber dieses neue Forschungsgebiet reges Interesse und Zulauf; so gab es im Jahr 2016 eine internationale Konferenz über Organoide (EMBO/EMBL 2016), und die Zeitschrift *Development* bringt ein Sonderheft zu diesem Themenkreis heraus (Little 2016; Little 2017). Bei dieser Forschung steht im Zentrum des Interesses die autonome Entstehung von geordneten Gewebs- und Organstrukturen in Stammzellkulturen, verbunden mit Versuchen zur Steuerung des Geschehens und mit der Erwartung, dass sich solche komplexen, *in vitro* entstandenen Gebilde bei der Erforschung von Krankheitsursachen, aber auch in der Klinik zur Transplantation eignen werden. Auf Einzelheiten der Organoidforschung gehe ich hier nicht ein; ich erwähne sie nur, um darauf hinzuweisen, dass die *Selbstorganisation* in Stammzellkolonien ein bekanntes Phänomen ist, das intensiv beforscht wird, und dass diese experimentellen Arbeiten schon ein Methodenspektrum hervorgebracht haben, welches für sich

daraus entwickelnde verwandte Forschungsgebiete zur Verfügung steht. Als ein Seitenzweig entsteht nämlich jetzt ein Interessensgebiet, das sich mit frühembryonaler Musterbildung und Embryo-Engineering befasst. Ergebnisse solcher neueren Forschungsarbeiten werde ich in den folgenden Abschnitten besprechen.

2.2.2 *Gastruloide*

Als Gastrulation wird der Vorgang bezeichnet, der im Primitivstreifen dazu führt, dass sich die drei Keimblätter in geordneter Weise bilden. Dabei werden auch die definitiven Körperachsen festgelegt, und so wird die Grundlage für den Körpergrundplan (»basic body plan«, Körpergrundgestalt) gelegt (Denker 2004b; Stern 2004). Ich diskutiere hier einige neuere Untersuchungen, die darauf abzielen, diese Vorgänge in vitro unter Verwendung von PPSC (auch menschlichen) nachzustellen und zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wird auch der neue Begriff »*Gastruloide*« als Bezeichnung für solche Entitäten auftauchen (siehe 2.2.2.2). Im Vergleich zu den oben angesprochenen Organoiden geht es diesem neuen Zweig der Forschung nicht um die Bildung von Organ-ähnlichen Strukturen, also nicht um Modelle der Organogenese, sondern um frühembryonale Musterbildungsvorgänge, also *Embryogenese*. Damit erreichen die ethischen Implikationen dieser Forschung eine ganz andere Dimension, denn hier geht es um Entwicklungsstadien, in denen die Individuation (im Sinn der Bildung einer Körpergrundgestalt) abläuft. In der Tat scheint sich hier ein eigenes, schnell expandierendes Forschungsgebiet zu entwickeln, ein Faktum, das von der Öffentlichkeit bisher kaum wahrgenommen worden ist. Diese Forschungsrichtung ist für den Embryologen prinzipiell von großem Interesse, sie ist aber ethisch hochproblematisch, wenn menschliche PPSC eingesetzt und dabei menschliche Embryogeneseprozesse nachgestellt werden.

2.2.2.1 Embryo-Engineering, Versuche zum Primitivstreifen-Nachbau

In einer Publikation aus dem Jahr 2014 haben Warmflash et al. eine Methodik vorgestellt, die es gestattet, die Selbstorganisationsfähigkeiten menschlicher ESC so zu steuern, dass in der In-Vitro-Kultur einige solcher Musterbildungsprozesse starten, wie sie im realen Embryo eine Rolle bei der Bildung der Körpergrundgestalt (»basic body plan«) spielen (Warmflash et al. 2014). Hauptbefund dieser Untersuchungen ist, dass die ESC eine inhärente Tendenz zeigen, nicht nur (wie bekannt war) sich zu verschiedenen frühembryonalen Zellarten zu differenzieren, sondern dass sich dabei spontan eine Anordnung dieser Zellen zu bestimmten frühembryonalen Mustern ergibt und dass ferner diese Muster und die gesamte Gestalt der sich differenzie-

renden Kolonie durch einfache physikalische Vorgaben der Kulturgefäße beeinflusst werden können. Die Autoren vergleichen das Ergebnis mit der Anordnung der Zellen in normalen menschlichen Embryonen in Keimscheibenstadien und stellen eine große Regelhaftigkeit fest, die sie als Anzeichen für eine einsetzende Morphogenese sehen und überraschend finden. So beschreiben sie: »an outer trophoctoderm-like ring, an inner ectodermal circle and a ring of mesendoderm expressing primitive-streak markers in between«. Die Zellen, die Primitivstreifen-Marker exprimieren, sind natürlich von besonderem Interesse wegen der herausragenden Bedeutung des Primitivstreifens für die frühembryonale Morphogenese (Bildung der Achsensysteme, Körpergrundgestalt, Denker 2004b; Stern 2004). Allerdings bildet sich in diesen Kolonien unter den von den Autoren gewählten Bedingungen kein typisch konfigurierter, länglicher und exzentrisch liegender Primitivstreifen, wie man ihn in einem menschlichen Embryo eines frühen Post-Implantationsstadiums (Keimscheibenstadium) beobachten würde. Es erscheint aber nicht unvernünftig zu erwarten, dass der Ring aus Trophoblastzellen (trophoctoderm), dessen Bildung sie beobachten, als Quelle für einen lokalen Signalaustausch dienen kann, wie er bekanntermaßen im Embryo für eine geordnete frühe Morphogenese bedeutsam ist. Die Autoren erwarten, dass sie im Sinn eines »Embryo-Engineering« durch Änderung der physikalischen Eigenschaften und der Mikro-Struktur der Kulturgefäßoberfläche erreichen können, dass sich die sich bildenden Strukturen an die eines realen menschlichen Embryos im Stadium der sich differenzierenden Keimscheibe annähern lassen. Sie regen dazu an (Warmflash 2014), dass auch andere Gruppen diese Methodologie anwenden sollten, um die experimentellen Möglichkeiten, die ein solches In-Vitro-Modell bietet, zu experimentell-embryologischen Untersuchungen zu nutzen. So könnte man in menschlichen Stammzellkulturen embryologische Untersuchungen durchführen, die in großem Maßstab an realen Embryonen (z. B. überzähligen Embryonen aus In-Vitro-Fertilisationsprogrammen) nicht durchführbar wären (und die in vielen Ländern zu Recht als ethisch ohnehin problematisch angesehen werden).

Tatsächlich ist denkbar, dass dieser technische Ansatz ausgeweitet wird und zu einer Art Embryo-Engineering in größeren Versuchsserien führen kann. Die Vermutung der Autoren, dass die Wahl geeigneter extrazellulärer Matrices und einer geeigneten Strukturierung des Kultursubstrats Chancen eröffnet, dass diese Keimscheiben- und Primitivstreifenmodelle normalen Embryonen immer ähnlicher werden, ist absolut im Einklang mit dem, was schon frühere Untersuchungen an Stammzellkulturen über die Rolle der Kulturbedingungen, von physikalischen Einflüssen und extrazellulärer Matrix auf Stammzellkulturen gezeigt haben (Behr et al. 2005; Maranca-Hüwel/Denker 2010; Poh et al. 2014).

Man bewegt sich hier in einem Grenzbereich zwischen (Optimierung von) Selbstorganisation von Stammzellkolonien und gezieltem Embryo-Engineering. Die Untersuchungen auf diesem Gebiet werden aller Wahrscheinlichkeit nach nicht nur das Engineering des Kultursubstrats (Deglincerti et al. 2016b), sondern auch den Einbau von Quellen (»local sources«) von morphogenetisch wirksamen Substanzen (Signalstoffen, Wachstumsfaktoren) einschließen (solche »local sources« können gezielt transplantierte Zellen, die diese Stoffe abgeben, aber auch unbelebte Depots sein), weil bekannt ist, dass auf diese Weise ein Embryo-Engineering erfolgreich vorangetrieben werden kann. Ein Beispiel für den prinzipiellen Erfolg eines solchen Konzepts ist die Herstellung eines »*synthetischen Embryos*« in einem Tiermodell, dem Zebrafisch (Xu et al. 2014). Diese Autoren haben gezeigt, dass es möglich ist, komplette, entwicklungsfähige Wirbeltier-Embryonen aus pluripotenten Zellen zu generieren. Die verwendeten Zellen waren aus Embryonen isoliert worden, waren also keine kultivierten Stammzellen, aber es ist davon auszugehen, dass ähnliche Strategien auch bei Säugetier-PPSC als Ausgangsmaterial erfolgreich sein können. Der experimentelle Ansatz von Xu et al. bestand darin, den Zellen *in vitro* eine relativ einfache Strukturinformation in Gestalt von künstlich geschaffenen, gegenläufigen Gradienten zweier Proteine zu bieten (Bone Morphogenetic Protein [BMP] und Nodal), von denen bekannt ist, dass sie in der Embryonalentwicklung eine Schlüsselrolle in der Ausbildung der Vorn-Hinten-Achse (Kraniokaudalachse) spielen. Die Schlussfolgerung der Autoren war: In diesem System pluripotenter Zellen ist die Schaffung dieses Gradienten »sufficient to initiate the principal molecular and cellular processes necessary to organize a complete embryonic axis. All other signaling pathways required to achieve full embryonic development are induced and regulated in response to the two initial, experimentally engineered signals.« In einem Interview erklärte einer der Autoren, dass sie vorhätten, die Anwendbarkeit dieses experimentellen Ansatzes bei Säugetier-Stammzellen zu testen, und dass sie zuversichtlich seien, auch in diesem Fall künstliche Embryonen schaffen zu können (Barney 2014). Über Ergebnisse exakt dieser Art von Experimenten ist bislang zwar nichts veröffentlicht worden, ich werde aber im nächsten Kapitel auf Untersuchungen zu sprechen kommen, die starke Hinweise darauf geliefert haben, dass es nicht unvernünftig ist, mit einem Erfolg solcher Experimente zu rechnen.

Vermutlich werden einige Arbeitsgruppen in den weiterführenden Experimenten die Konzepte der genannten zwei Arbeitsgruppen (Warmflash et al. 2014; Xu et al. 2014), d. h. die Anwendung von physikalischen und biochemischen Determinanten, kombinieren und damit wesentliche Fortschritte in der Schaffung künstlicher Körpergrundgestalt-Anlagen (im Sinn eines Embryo-Engineering) machen; Versuche in dieser Richtung sind bereits im Gange (Etoc et al. 2016). Wenn dabei menschliche Zellen (hESC, hiPSC) verwendet

werden, wie im Fall der Arbeiten von Warmflash et al. und Etoc et al. (Warmflash et al. 2014; Etoc et al. 2016), dann haben wir hier ein massives ethisches Problem vor uns. Wo sollen Grenzen für solche Forschungen gesetzt werden, welche konkreten Restriktionen sind vernünftigerweise überhaupt noch diskutierbar angesichts der Tatsache, dass hPPSC (ESC und iPSC) weltweit in unzähligen Labors in sehr unterschiedlichen Forschungsprojekten im Einsatz sind?

2.2.2.2 Autonom entstehende Gastruloide

Um sich der Frage zu nähern, wie es in solchen Forschungskontexten um das Verhältnis von Natürlichkeit und Künstlichkeit, um Autonomie vs. Heteronomie bestellt ist, sollten wir einen genaueren Blick auf Forschungen werfen, in denen die Selbstorganisationsfähigkeiten beleuchtet werden, ohne von vornherein gezielt in die autonomen Strukturierungsprozesse wie in den eben diskutierten Arbeiten einzugreifen. Wie viel aktives Eingreifen (im Sinn eines »Embryo-Engineering«) ist demnach für die Bildung eines Körpergrundplans in Stammzellkolonien erforderlich, und wie viel Autonomie kann sich hier in der In-Vitro-Kultur zeigen?

In den ersten Jahren der Forschung an PPSC ist der frühembryonalen Musterbildung in Stammzellkolonien nur wenig Aufmerksamkeit gewidmet worden, denn die Forschung konzentrierte sich auf die Art der sich differenzierenden Zellen und ihre Verwendungsmöglichkeiten. Wenn sich bildende Muster/Strukturen beobachtet wurden, so waren dies Zufallsbefunde, die eher en passant mitgeteilt wurden, ohne dass man gezielt versucht hätte, diese Musterbildung zu induzieren oder zu beeinflussen, d. h. diese Ordnungsprozesse als Modellfall für kausalanalytische Untersuchungen der Embryogenesevorgänge zu verwenden. Ein besonders eindrucksvoller Befund war der einer (an das Kultursubstrat angehefteten) Kolonie von ESC des Weißbüscheläffchens (*Callithrix jacchus*), die sich in vitro spontan zu einer Struktur entwickelt hatte, die morphologisch sehr weitgehend einem Primatenembryo in einem Keimscheibenstadium mit Primitivstreifen glich (Thomson et al. 1996). Die Autoren identifizierten die einzelnen Elemente dieser Struktur als Keimscheibe mit Epiblast und Hypoblast, außerdem die extraembryonalen Strukturen Amnion (mit Amnionhöhle) und Dottersack. Besonders bemerkenswert: Innerhalb der Keimscheibe entdeckten die Autoren eine Struktur, die die morphologischen Charakteristika eines frühen Primitivstreifens mit allen Anzeichen einer dort ablaufenden EMT (Epithel-Mesenchym-Transition), d. h. einer Gastrulation zeigte (abgebildet in Denker 2004b). Da der Primitivstreifen (mit seinem Vorderende, dem Hensenschen Knoten, als Organisator) die wesentliche Struktur für die Herausbildung der definitiven Körperachsen und der Körpergrundgestalt beim Säugetier ist

(Denker 2004b; Stern 2004), würde diese Beobachtung, wenn sie so richtig interpretiert worden ist, bedeuten, dass in dieser Weißbüscheläffchenstammzell-Kolonie die Bildung eines Embryonalkörpers, eine Individuation, im Gange war.

Diese Schilderung von Thomson et al. (Thomson et al. 1996) ist in den ersten Jahren, nachdem die Forschungen an hESC begonnen worden waren und die ethischen Implikationen kontrovers diskutiert wurden, von einigen Autoren als eine Falsch-(Über-)Interpretation eines völlig ungewöhnlichen und nicht wirklich aussagekräftigen Befundes eingeordnet worden. Dabei wurde bezeichnenderweise die Tatsache, dass Thomson et al. sogar die Bildung einer Primitivstreifen-ähnlichen Struktur beschrieben hatten, nicht erwähnt (und z. B. in einer Skizze, die den Hauptbefund illustrieren sollte, fortgelassen, vgl. Abb. 4.3 in Beier 2001). Das war, wohlgermerkt, in der Zeit, in der in Deutschland gesetzgeberische Maßnahmen zur eventuellen Anpassung des Embryonenschutzgesetzes zum Zweck der Ermöglichung von Forschung an hESC intensiv und kontrovers diskutiert wurden, durchaus unter Vorgaben zu politischen Absichten. Inzwischen hat sich die Situation gewandelt. Forschung an hPPSC (ESC und iPSC) ist international zur Routine in vielen Labors geworden, und vielleicht liegt es daran, dass ein Gefühl der politischen Entspannung aufgekommen ist, so dass nun in diesem Klima in verschiedenen Labors ganz unaufgeregt genauer nachgeschaut werden kann, wie es sich um autonome Formbildungsprozesse in Kolonien von PPSC in vitro verhält. Wie brisant das Thema in Wirklichkeit ist, sobald menschliche Zellen zum Einsatz kommen, ist dabei offenbar etwas in Vergessenheit geraten.

Eine Arbeit aus dem Jahr 2008 war Auslöser für Nachuntersuchungen und für ein ansteigendes Interesse an frühembryonalen Selbstorganisationsprozessen in Aggregaten von PPSC in vitro. Diese Autoren (ten Berge et al. 2008) waren überrascht zu beobachten, dass frei flottierende Aggregate von ESC der Maus (mESC) während ihrer einsetzenden Differenzierung zu »embryoid bodies« autonom eine räumliche Anordnung von Genexpressionsmustern (Wnt-Signale) entwickelten, wie sie typischerweise in Gastrulationsstadien zu beobachten ist (»endogenous Wnt signals polarize the embryoid body and mediate the local execution of a gastrulation-like process«). Zuvor war von den meisten Autoren angenommen worden, dass die schon lange bekannten »embryoid bodies« keine räumliche Ordnung im Sinn der Körper-Hauptachsen ausbilden, sondern eher radiärsymmetrische Strukturen sind. Dieser Report führte zu einem neuen Forschungsinteresse an autonomer Entstehung frühembryonaler Musterbildung, das gerade auch die für die Individuation und die Bildung der Körpergrundgestalt so wichtigen Vorgänge der Primitivstreifenbildung (Gastrulation) ins Visier nimmt. Es kulminiert in der Frage, ob oder in welchem Umfang für diese Prozesse der Bildung einer Körper-

längsachse (»symmetry breaking«) Signale von außerhalb des Zellaggregats nötig sind (z. B. vermittelt durch Anheftung an die Kulturgefäße, entfernt verglichen mit der Implantation eines Embryos im Uterus), oder ob diese Prozesse völlig autonom starten können (in einer entwicklungsbiologisch neutralen Umgebung, hier: frei flottierend).

Im Kontext dieser Untersuchungen der letzten Jahre ist der Terminus »Gastruloide« eingeführt worden. Damit sollen Entitäten bezeichnet werden, die aus Stammzellen *in vitro* entstehen und mehr oder weniger getreu die Struktur von Embryonen im Primitivstreif-/Gastrulationsstadium widerspiegeln (oder ein solches Stadium sind) (van den Brink et al. 2014). In Fortführung der obengenannten Untersuchungen von ten Berge et al. (ten Berge et al. 2008) haben van den Brink et al. kleine Aggregate von ca. 300 ESC der Maus in einer Suspensionskultur gehalten, d. h. nicht zur Anheftung an das Kulturgefäß gebracht; außerdem wurden Kulturbedingungen gewählt, unter denen die Bildung von Zellen des dritten Keimblatts, des Mesoderms, gefördert wird (N2B27 Medium für 2 Tage, danach Zusatz von Activin A und einem Agonisten des Wnt/beta-Catenin-Signalwegs, CHIR99021). Unter diesen Kulturbedingungen beobachteten die Autoren, dass die mESC-Aggregate autonom, d. h. ohne externe Asymmetriesignale (etwa durch Anheftung) begannen, (1.) Mesoderm-Zellen zu bilden (angezeigt durch die Expression des Mesoderm-Markers Brachyury), und (2.) eine polare Architektur auszubilden. Letzteres sehen diese Autoren zu Recht als besonders bemerkenswert an. Sie fassen diese Befunde so zusammen:

Over time, brachyury expression becomes restricted to a small population of cells at a tip of the aggregate, which acts as a source of cells that express Tbx6, a mesoderm gene, and these cells are extruded from the main body of the aggregate in a process that is reminiscent of some of the movements of gastrulation.

Die Autoren schließen daraus: Die ESC-Aggregate »self-organise into polarised structures that exhibit collective behaviours reminiscent of those that cells exhibit in early mouse embryos.« Wegen dieser Entsprechung zu den Vorgängen, die im Primitivstreifen ablaufen, haben die Autoren vorgeschlagen, »[to] call these aggregates »gastruloids««. Sie resümieren, dass die Bildung dieser Gastruloide »showed that, although for the most part they are *autonomous* in their development, the culture conditions influence the cell types that develop within them« (Hervorhebungen HWD).

Man muss durchaus betonen, dass diese aus mESC *in vitro* hergestellten »Gastruloide« trotz des überraschend hohen strukturellen Ordnungsgrads, den sie autonom erreicht haben, immer noch morphologisch weit weniger regulär strukturiert waren als *in vivo* entwickelte (und im Uterus implantierte) Embryonen der Maus. Auf die Frage, ob dies darauf zurückzuführen

ist, dass diesen *in vitro* gebildeten Gastruloiden vielleicht instruktive Faktoren fehlten, die *in vivo* der Uterus im Rahmen der Implantation beitragen würde, komme ich im nächsten Abschnitt zurück; die Fakten sprechen allerdings dagegen. Auf jeden Fall ist als wesentliche Erkenntnis aus den hier geschilderten Untersuchungen festzuhalten, dass der grundlegende Morphogenesevorgang, das Brechen der radiären Symmetrie und die Entstehung einer polaren Anordnung der Zellen (als Voraussetzung für die Positionierung eines Primitivstreifen-Äquivalents und damit für die anterior-posteriore Körperachse) in diesen ESC-Aggregaten autonom startete, in Suspension, ohne lokalisierte (asymmetrisch angebotene) externe Signale. (Die entwicklungsbiologischen Mechanismen, die einen solchen autonomen Start von Musterbildungsprozessen in PPSC-Kolonien auch aufgrund stochastischer Inhomogenitäten möglich machen, habe ich früher ausführlich diskutiert (Denker 2004b)). Eine Anheftung an das Kulturgefäß war nicht nur nicht nötig sondern für geordnete Morphogenese sogar schädlich. Das passt zu einer Beobachtung, die mit normalen Blastozysten der Maus schon vor vielen Jahren gemacht wurde: Ihre normale Morphogenese wird gestört, wenn man sie zur Anheftung an eine atypische Umgebung bringt (z. B. an die Oberfläche eines Kulturgefäßes), und zwar ausgehend von Störungen in der Anordnung der extraembryonalen Gewebe wie Trophoblast und Dottersack (Wiley and Pedersen 1977). In dieser Hinsicht verhalten sich normale Blastozysten der Maus und PPSC also vergleichbar.

Kurz vor Fertigstellung des Manuskripts des vorliegenden Beitrags erscheint nun eine Arbeit aus der Gruppe von Magdalena Zernicka-Goetz, die über eine noch sehr viel weiter gehende Morphogenese von Stammzellkolonien *in vitro* berichtet (Harrison et al. 2017). In diesen Versuchen wurden ESC mit Gruppen von Trophoblast-Stammzellen (TSC), beide von der Maus, innerhalb einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix (Matrigel) in Kontakt gebracht. Dadurch wurde bezweckt, dass die zwei Stammzellgruppen eine Interaktion (cross talk) beginnen konnten, die den Signalaustausch simuliert, der in der normalen Embryogenese zwischen Trophoblast (extraembryonalem Ektoderm) und Epiblast bei der Bildung des sogenannten Eizylinders der Maus abläuft und für die Morphogenese der Körpergrundgestalt eine wesentliche Rolle spielt. Das Kultursystem entspricht dem, das von derselben Gruppe als Modell für die Differenzierung von Blastozysten *in vitro* entwickelt wurde, und über das ich im nächsten Kapitel berichte (2.3). Das mitgeteilte Ergebnis ist frappant: Unter diesen Bedingungen bilden sich, ohne dass man ein gezieltes Embryo-Engineering durchführen müsste, aus den Stammzellen *in vitro* Strukturen, die weitgehend normalen Mäuseembryonen im Eizylinderstadium entsprechen (die Autoren nennen dies »ETS-embryogenesis«). Es bildet sich nicht nur eine Proamnionhöhle sondern auch ein Äquivalent des Primitivstreifens, und wie die Marker-Untersuchungen

zeigen, werden offenbar auch primordiale Keimzellen (PGC) gebildet. Die Autoren fassen als Hauptbefunde zusammen:

(1) The spontaneous self-organization leading to polarization and then epithelization and lumenogenesis first in the embryonic (ESC) and then cavitation in the extra-embryonic (TSC) compartments; (2) the unification of embryonic and extra-embryonic cavities into the equivalent of the embryo's pro-amniotic cavity; (3) the crosstalk between embryonic and extra-embryonic compartments, involving Nodal signaling, that builds characteristic embryo architecture; (4) the self-organization of embryonic and extra-embryonic compartments resulting in asymmetric induction of the localized expression of mesoderm markers at the compartment boundary in a Wnt-dependent manner; and (5) the provision of BMP signaling to specify the PGC-like cells, equivalent to their formation in the embryo. These morphogenetic events follow similar spatiotemporal dynamics during ETS-embryogenesis as they do in natural embryogenesis.

Diese aus Stammzellen entstandenen Embryoide wären vermutlich auch zur weitergehenden Entwicklung einer sich ausdifferenzierenden Körpergrundgestalt fähig. Um eine komplette Weiterentwicklung möglich zu machen, wäre nur noch erforderlich, dieses Stammzellen-Konstrukt durch eine künstliche Plazenta zu ergänzen; technisch derzeit noch schwierig, aber sicher ebenfalls nur eine Frage der Zeit. Ich habe übrigens schon vor Jahren vorhergesagt, dass die Konstruktion von Embryonen aus ESC und TSC möglich sein sollte, vor allem unter Vorgabe einer gewissen Asymmetrie (die hier wahrscheinlich durch die asymmetrische Anlagerung der Gruppe von TSC erreicht wird). Außerdem bemerkenswert ist in diesen Experimenten von Harrison et al., dass diese aus Stammzellen generierten Embryonen auch Keimbahnzellen (PGC) bildeten, anscheinend orthotopisch.

Im Vergleich mit Morphogeneseexperimenten, die mit menschlichen PPSC durchgeführt wurden (s. o., Warmflash et al. 2014), ist hervorzuheben, dass in den Untersuchungen von Harrison et al. gezielt Zellen vom Trophoblasttyp (mTSC) mit den mESC kombiniert worden sind, und zwar in einer asymmetrischen Anordnung. Von Primaten-PPSC (einschließlich Mensch) ist bekannt, dass sie (im Gegensatz zu mESC) ein hohes spontanes Trophoblastdifferenzierungspotential besitzen (es kann durch Wachstumsfaktorzugabe noch erhöht werden, vgl. Kojima et al. 2017); dem entspricht auch die von Warmflash et al. beobachtete spontane Bildung eines äußeren Rings aus Trophoblastzellen. In Kulturen von hPPSC ist daher ein Zusatz von Trophoblasttyp-Zellen nicht erforderlich. Wie ich schon früher ausführlich diskutiert habe, kann auch eine Asymmetrie (wie sie in den Versuchen von Harrison et al. künstlich durch die gewählte Anordnung der zwei Zellgruppen vorgegeben wurde) sich stochastisch in der Kultur ergeben (Denker 2004b). Daher ist ein spontaner Start von derartigen frühembryonalen Morphogenesevor-

gängen in dichten Kulturen von Primaten-PPSC grundsätzlich als seltenes Ereignis möglich, natürlich abhängig von den gewählten Kulturbedingungen. (In der Standard-Kultur von Primaten-PPSC wird peinlich darauf geachtet, dass sich keine differenzierten Kolonien bilden; die Kulturen werden absichtlich immer schnell passagiert, um dies zu verhindern. Daher muss man sich nicht wundern, wenn man unter Routinebedingungen kaum einmal zufällig frühembryonale Musterbildungsprozesse beobachtet.)

Da die besprochenen mehr oder weniger Embryo-ähnlichen Konstrukte *in vitro* zum Teil in Suspension, zum Teil aber im Kontakt mit extrazellulärer Matrix oder dem Kulturgefäß entstanden sind (wodurch Surrogat-Assymmetriesignale zustande gekommen sein könnten), leiten sie über zur Diskussion einer fraglichen Rolle der Implantation im Uterus.

2.3 EINE BEDEUTUNG DES UTERUS FÜR DIE MORPHOGENESE?

In den Diskussionen um die Ethik der Stammzellgewinnung aus frühen Embryonen hat seit Jahren die Sichtweise dominiert, dass zwar Blastozysten die volle Entwicklungsbefähigung (Totipotenz) besitzen, dass aber Zellen des Embryoblasten (der Inneren Zellmasse, ICM), die man ihnen entnimmt und in der In-Vitro-Kultur zu Stammzellen werden lässt, nur eine reduzierte Potenz (meist als Pluripotenz bezeichnet) haben.²

Man sollte also meinen, dass es keinen Grund gibt, über die Entwicklungspotenz (im Sinn der prinzipiellen Fähigkeit zur Selbstorganisation) von *Embryonen im Blastozystenstadium* überhaupt noch nachzudenken. Um so überraschender ist, dass 2016 zwei Publikationen erschienen sind, in denen die Begriffe Selbstorganisation und Autonomie von menschlichen Blastozysten zum Leitthema gemacht werden, und zwar im Hinblick auf die Beziehungen zwischen Morphogenese und *Implantation* (Deglincerti et al. 2016a; Shahbazi et al. 2016). Ich will auf diese Arbeiten hier nur relativ kurz eingehen, weil ich sie an anderer Stelle ausführlich diskutiert habe (Denker 2016).

² Ich sehe in diesem Beitrag von einer Diskussion der verwirrend unterschiedlichen Definitionen verschiedener Autoren für Potentialitätsgrade, wie Totipotenz, Omnipotenz, Pluripotenz, Pluripotenz, volle Pluripotenz, naive oder geprimte Pluripotenz, ab und verwende die Begriffe entsprechend dem hier skizzierten häufigsten Sprachgebrauch. Diese vereinfachte Terminologie benutzt den Begriff Pluripotenz in dem Sinn, dass pluripotenten Zellen (PPSC) das Potential zur Selbstorganisation bis zur Bildung eines lebensfähigen Körpers fehlt, während totipotente Entitäten (z. B. Morulae, Blastozysten) ein komplettes Selbstorganisationspotential bis zum lebensfähigen Organismus besitzen. Ich selbst favorisiere anstelle von Pluripotenz den Begriff Omnipotenz für Zellen, aus denen sich *alle* Zellarten differenzieren können (und nicht nur eine begrenzte Zahl, wie »plures« fälschlich signalisieren könnte); in dem vorliegenden Beitrag verwende ich aber dafür den Terminus Pluripotenz als Konzession an den am weitesten verbreiteten Sprachgebrauch (für eine detaillierte Diskussion s. Denker 2014).

Dort bespreche ich auch Details der existierenden Theorien zu den biologischen Grundprozessen der Keimblatt- und Körperachsenbildung beim Säugetierembryo in Relation zur Implantation.

In den genannten Arbeiten (Deglincerti et al. 2016a; Shahbazi et al. 2016) haben die Autoren ein verbessertes System für die In-Vitro-Kultur menschlicher, für Forschungszwecke gespendeter Blastozysten angewendet, in dem die Embryonen sich an die Oberfläche des Kulturgefäßes anheften konnten, ähnlich wie in dem seit langem bekannten »Embryo-Outgrowth-System«. Die Besonderheit des verbesserten Systems ist die Einhaltung einer bestimmten Sequenz der Behandlung mit Wachstumsfaktoren und mit Proteinen, die für die Anheftung Bedeutung haben. Das wesentliche Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass die Blastozysten unter diesen Bedingungen in vitro Morphogeneseprozesse weiterführen, die man bei menschlichen Embryonen bisher nur in ex-vivo-Material, den Präparaten der Carnegie Collection, hatte studieren können: Bildung von Amnionhöhle, Dottersack und Keimscheibe. Die Autoren vergleichen mit den Präparaten der Carnegie Collection und kommen zu dem Schluss, dass der in vitro unter diesen Versuchsbedingungen erreichte Entwicklungsstand den Carnegie-Stadien 5 b-c entspricht. Ähnlich wie in der oben diskutierten Arbeit von Warmflash et al. (Warmflash et al. 2014) haben auch diese Autoren die Kultivierung beendet, bevor ein Primitivstreifenstadium erreicht werden konnte; sie haben aber offenbar damit gerechnet, dass ihr Kultursystem eine weitergehende Morphogenese in vitro prinzipiell ermöglichen könnte (Beendigung der Kultur »at d.p.f. [days post fertilization] 14, in accordance with internationally recognized bioethical guidelines« (Deglincerti et al. 2016a).

Im Hinblick auf bioethische Implikationen sind an diesen Publikationen vor allem zwei Aspekte bemerkenswert:

1. Neue experimentelle Möglichkeiten und Appell für Aufhebung bisheriger Restriktionen: Blastozysten besitzen, wie hier gezeigt wurde, eine morphogenetische Potenz, die die Fähigkeit zur Bildung sowohl extraembryonaler Strukturen wie Amnionhöhle und Dottersack als auch der Embryonalanlage im engeren Sinn, das heißt der Keimscheibe, umfasst, so dass diese Strukturen sich sogar in einem sehr einfachen In-Vitro-System bilden können. Es ist zu erwarten, dass dieses Kultursystem prinzipiell auch die Bildung eines Primitivstreifens in vitro zulassen würde. Damit könnte es sich anbieten als ein System, das *experimentelle Untersuchungen über Grundprozesse der Morphogenese* an menschlichen Embryonen in Entwicklungsstadien ermöglicht, die, weil es sich *in vivo um Postimplantationsstadien* handeln würde, dem experimentellen Zugriff (in utero) nicht zugänglich wären. Bemerkenswerterweise sind diese beiden Arbeiten (Deglincerti et al. 2016a; Shahbazi et al. 2016) schon zum Zeitpunkt ihrer Publikation von drei vorbereiteten Kommentaren

begleitet worden (Hyun et al. 2016; Reardon 2016; Rossant 2016), in denen dafür plädiert wurde, jetzt angesichts der sich hier eröffnenden Chancen für embryologische Forschung die bisher in vielen Ländern geltende Regel einer ethischen Grenze für Forschung an menschlichen Embryonen bei der Bildung des Primitivstreifens (14-Tage-Regel) zu überdenken, nämlich mit dem Ziel, solche Forschungen nun unter Verwendung gespendeter menschlicher Embryonen möglich zu machen.

2. *Autonomie*: Eine *Implantation* im Uterus ist nach diesen Beobachtungen für die frühe Morphogenese menschlicher Embryonen bis zum Keimscheidenstadium nicht erforderlich; im Zusammenhang mit dieser Feststellung verwenden die Autoren das Schlagwort »*Selbstorganisation*« (»self-organization«). Vermutlich könnte die Entwicklung auch darüber hinaus bis mindestens zur Primitivstreifenbildung und der Bildung der Körpergrundgestalt weiterlaufen, aber die Versuche wurden in diesem Stadium abgebrochen. Als Surrogat für die *Implantation* ist eine Anheftung an ein Kulturgefäß ausreichend, aber ob diese Anheftung überhaupt erforderlich ist, blieb in diesen Untersuchungen unklar. Es gab Anzeichen dafür, dass die Anheftung an das flache Kultursubstrat ein gewisses, initial hilfreiches Asymmetriesignal sein könnte, dass sie sich aber in den letzten der untersuchten Stadien ungünstig auf den weiteren Fortgang der Morphogenese auswirkte. Das hängt mit großer Wahrscheinlichkeit damit zusammen, dass in utero in diesen Stadien eine Dreidimensionalität der extraembryonalen Strukturen vorliegt, die das verwendete Kultursystem nicht zulässt. Die technologische Weiterentwicklung wird hier ansetzen und wird, da eine Reihe von dreidimensionalen Kultursystemen bereits aus anderen Untersuchungen (u. a. über Organoide) bekannt ist, sehr wahrscheinlich den Erfolg bringen, dass die Morphogenese in vitro noch sehr viel weiter vorangetrieben werden kann, aller Wahrscheinlichkeit nach einschließlich der Primitivstreifen- und Post-Primitivstreifen-Stadien (vgl. die im vorigen Kapitel besprochenen Versuche zum Embryo-Engineering bei der Maus, Harrison et al. 2017).

Dass die Anheftung bei der *Implantation* eine instruktive Bedeutung für die Morphogenese der Embryonalanlage besitzt, ist eine Vorstellung, die eigentlich schon seit langem als überholt gelten müsste, denn sie ist sowohl durch in-vivo-Experimente (Blockade der *Implantation* durch Proteinase-Inhibitoren bei Kaninchen) als auch durch In-Vitro-Kulturversuche (Maus) widerlegt (im Detail diskutiert in Denker 2016). Von daher sind die Beobachtungen über eine sehr weit fortschreitende Entwicklung menschlicher Blastozysten in der In-Vitro-Kultur nicht wirklich überraschend. Immerhin zeigen sie, dass biochemische Faktoren (etwa verschiedene Uterus-spezifische Proteine), die, vom Endometrium sezerniert, in vivo normalerweise dem Embryo zur Verfügung gestellt werden, für die Morphogenese nicht

essentiell sind, denn Endometrium war ja in diesem Kultursystem nicht vorhanden. Die Beobachtungen unterstreichen daher einen wichtigen Aspekt: die *Autonomie* des frühen Embryos bezüglich der Morphogenese. Die Autoren streichen dies auch in ihren Schlussfolgerungen heraus: »... the embryo alone can direct both lineage specification and diversification, as well as tissue morphogenesis and architectural organization, without maternal input« (Deglincerti et al. 2016a).

Die von manchen Autoren zuvor geäußerte Vorstellung, dass die Blastozyste entwicklungsbiologisch gesehen noch keine komplette Formbildungskompetenz besitze, sondern dass sie für die Achsenbildung (Primitivstreifenbildung, Körpergrundgestalt) instruktive Signale benötige, die durch die Implantation im Uterus vermittelt würden, sollte damit eigentlich endgültig aus der Welt sein. Sie ist zwar durchaus nicht von allen einschlägig tätigen Wissenschaftlern vertreten worden, auch von mir nicht (zur Literatur s. Denker 2016), war aber über Jahre hin in den Kreisen derjenigen Forscher weit verbreitet, die sich auf das Maus-Modell konzentrieren. In diesen Kreisen hat nun erst in der letzten Zeit ein Umdenken eingesetzt. Ich habe die historischen Hintergründe und die Details der bekannten biologischen Fakten schon ausführlich diskutiert (Denker 2016) und muss dies hier nicht wiederholen. Aber da man ja aus Fehlern der Vergangenheit zu lernen bereit sein sollte, ist es gut, sich zu erinnern, dass während der Hochkonjunktur der Stammzellethik-Debatten in Deutschland (Anfang der 2000er Jahre) das Argument, noch nicht implantierte Blastozysten hätten ja noch gar nicht die volle Entwicklungskompetenz, eine bedeutende Rolle gespielt hat. Allerdings gab es schon damals harte experimentelle Daten, die belegten, dass diese Behauptung falsch war (diskutiert in Denker 2016). Dass politische Debatten manchmal eine ehrliche Verankerung in verfügbaren Fakten vermissen lassen, lässt sich nicht erst in jüngster Zeit beobachten. Was ethische Implikationen der jetzt beobachteten entwicklungsbiologischen Autonomie von Blastozysten anbelangt, so meine ich, dass man der obengenannten Forderung der Kommentatoren (Hyun et al. 2016; Reardon 2016; Rossant 2016) nach Überdenken der 14-Tage-(Primitivstreifen-)Regelung Unlogik vorwerfen muss: Aus der Beobachtung, dass der Autonomiegrad dieser Entitäten größer ist, als erwartet worden war, ist logischerweise nicht eine Forderung nach Zuschreibung eines niedrigeren Schutzanspruchsgrades herzuleiten.

3. SCHUTZWÜRDIGKEIT VON PLURIPOTENTEN STAMMZELLEN, FRÜHEN EMBRYONEN UND EMBRYOIDEN KONSTRUKTEN: WAS DIE ENTWICKLUNGSBIOLOGIE HIERZU SAGEN KANN

3.1 »ABSURD EXTENSION«

In der Diskussion über ethische Aspekte der Stammzellforschung ist in den letzten Jahren das Potentialitätsargument durch den Begriff der »absurd/absurdest extension« (Stier/Schöne-Seifert 2013) in Misskredit gebracht worden: Dort wird argumentiert, dass die Herstellung von iPSC zeige, dass man wohl jede somatische Körperzelle durch Reprogrammierung mit Pluripotenz (und anschließend durch Verfahren wie die TK mit der Potenz zur [assistierten] Embryo-Bildung) ausstatten kann; daher sei jede somatische Körperzelle auch sozusagen »potentiell pluripotent« (oder je nach Definition sogar totipotent). Das Potentialitätsargument helfe aus diesem Grund in der bioethischen Diskussion nicht weiter. Diese Denkfigur sagt in manchem Detail des gedanklichen Wegs Richtiges und leitet doch hinsichtlich der Kernfrage, bei der es um die Ethik des Umgangs mit solchen Entitäten geht, fehl: Sie hebt ganz überwiegend auf eine *passive* Potenz ab (ausgehend vom Beispiel der TK, bei der nicht eine autonome Entwicklungspotenz, sondern nur die Entwicklung eines sehr artifiziellen Konstrukts getestet wird), nicht auf eine *aktive* Entwicklungspotenz. Wie ich schon früher hervorgehoben habe (Denker 2009b), ist für ein entwicklungsbiologisches Potentialitätsargument in erster Linie die aktive Potenz (im aristotelischen Sinn) von Interesse, d. i. die Fähigkeit zu autonomer Entwicklung, die Selbstorganisationsfähigkeit. Diese Argumentation hat daher auch immer im Zentrum meiner einschlägigen Publikationen (seit Denker 1999) gestanden. Die Diskussion der aktiven Potenz kommt bei Stier und Schöne-Seifert (Stier/Schöne-Seifert 2013) dagegen entschieden zu kurz und erfasst nicht die neueren Erkenntnisse zur Selbstorganisation und ihre komplexe Relation zum Embryo-Engineering, die ich oben diskutiert habe.

Die oben diskutierten neueren Untersuchungen zeigen deutlich, dass wir aktuell in immer stärkerem Maß Veranlassung haben, uns in solchen Diskussionen mit der aktiven Potenz, d. h. dem Vorhandensein bzw. der Entstehung einer Fähigkeit zur autonomen Morphogenese, zu beschäftigen. Zunächst einmal scheint es angebracht zu sein, dann, wenn man die Ethik des Umgangs mit Stammzellen diskutieren will, den Blick nicht auf die Potentialität der einzelnen Zellen, sondern auf die von Zell-Aggregaten, Kolonien, zu richten und diese dann mit embryoiden Konstrukten und schließlich mit frühen Embryonen zu vergleichen. Aggregate bilden sich nämlich in Stammzellkulturen immer auch ungewollt. Dabei muss es um die Frage gehen, ob die Entitäten

zur autonomen Entwicklung einer organismischen Ganzheit fähig sind oder dazu externe Instruktionen benötigen.

Ich habe bereits früher vorgeschlagen, zum Zweck der Klarheit die eingesetzten Begriffe schärfer zu definieren:

- *Totipotenz*: Fähigkeit, alle Zellarten zu bilden, plus Fähigkeit zur *autonomen* Bildung (Selbstorganisation) einer Körpergrundgestalt (Beispiele: Zygote, frühe Blastomeren auch nach Isolation, Morula, Blastozyste);
- *Pluripotenz/Omnipotenz* (s. Fn. 2): Fähigkeit, alle Zellarten zu bilden, aber Fehlen der Fähigkeit zur Selbstorganisation einer Körpergrundgestalt (*Heteronomie*, Abhängigkeit von externen Signalen bezüglich der Bildung eines Körpergrundplans) (Beispiel: PPSC; allerdings können Kolonien oder Konstrukte aus PPSC unter bestimmten Bedingungen, wie diskutiert, Totipotenz entwickeln).

Man kann diese zwei Arten der Potentialität zu den klassischen Begriffen der *aktiven* und der *passiven Potenz* in Beziehung bringen (Denker 2009b), und zwar in Beziehung zum Vorhandensein oder Fehlen der Fähigkeit der autonomen Bildung einer Körpergrundgestalt.

In der Argumentation zur »absurd/absurdest extension« (Stier/Schöne-Seifert 2013) wird ganz überwiegend auf die TK abgehoben. Mit der TK wird aber nur der Fall der assistierten, eindeutig nicht-autonomen Entwicklung ins Visier genommen. Die TK als Test zeigt nicht mehr an als die Fähigkeit der transplantierten Zellen, in Kombination mit und unter Instruktion durch Hilfszellen (tetraploidisierte Blastomeren oder eine Blastozyste aus tetraploiden Zellen) eine Morphogenese zu einem kompletten Embryonalkörper zu vollziehen. Die Hilfszellen liefern in diesem Fall das strukturierende Prinzip, das den getesteten Stammzellen fehlt. Daher zeigt die TK eine passive, aber keine aktive Potenz an (Dass auch diese passive Potenz durchaus eine bemerkenswerte Eigenschaft ist, die somatische Stammzellen oder Nicht-Stammzellen wie Fibroblasten nicht haben (Denker 2006), steht auf einem anderen Blatt). Die TK wirft zwar auch ihrerseits ethische und juristische Fragen auf, zum Beispiel personen- und patentrechtliche (Denker 2004a; Denker 2008), hilft aber nicht wirklich bei der Diskussion ethischer Aspekte der Totipotenz als Fähigkeit zur autonomen Individuation. Die Selbstorganisation (autonome Morphogenesebefähigung) stellt das stärkere ethische Argument dar.

3.2 ENTWICKLUNGSBIOLOGISCHE ASPEKTE VON AUTONOMIE UND ORGANISMISCHER GANZHEIT UND IHRE RELATION ZUR SCHUTZWÜRDIGKEIT VON EMBRYONEN UND EMBRYOIDEN

Was unterscheidet, entwicklungsbiologisch betrachtet, eine Morula von einer undifferenzierten Kolonie pluripotenter Stammzellen?

Wir haben im vorigen Abschnitt gesehen, dass die Blastozyste die volle Morphogenesekompetenz besitzt, und dass sie diese nicht erst durch die Implantation im Uterus erhält. Der Fortgang der Morphogenese ist also vom Stadium der Blastozyste ausgehend prinzipiell autonom möglich. Da in der In-Vitro-Kultur (unter den bekannten Standardbedingungen, die zum Beispiel die In-Vitro-Fertilisierungszentren verwenden) Furchungsstadien (Morulae) sich regelmäßig zu Blastozysten entwickeln (falls man die Kulturzeit so lange ausdehnt), gilt diese Feststellung auch für Morulae. Dies alles steht im Einklang mit der Definition des Totipotenzbegriffs, den das deutsche Embryonenschutzgesetz unterstellt.

Ein Aggregat aus pluripotenten Stammzellen (PPSC) zeigt allerdings unter den gleichen Bedingungen in aller Regel keine so weit gehende Morphogenese: In der Suspensionskultur (die der Standard-In-Vitro-Kultur von Embryonen entspricht) entstehen ja, wie wir oben diskutiert haben, maximal Gastruloide, keine morphologisch völlig normal gestalteten Primitivstreifenstadien, wenn keine zusätzlichen Kunstgriffe bis hin zu einem gezielten Embryo-Engineering angewendet werden (eine spontane Morphogenese, wie im Fall der oben diskutierten, von Thomson et al. beschriebenen Weißbüscheläffchen-Stammzellkolonie ist ein sehr seltenes Ereignis). Allerdings gelingt es nun in der letzten Zeit der experimentellen Forschung, wie oben diskutiert, die Morphogeneseleistungen von Stammzellen unter Anwendung der wachsenden Kenntnisse der Organoidforschung erheblich weiter voranzutreiben: Eine Optimierung der Zahl der eingesetzten Zellen, ihrer sterischen Anordnung, der Medien und die Verwendung eines dreidimensionalen Gel-Substrats (Matrigel) ergeben bereits eine dramatische Steigerung der Morphogeneseleistung bis hin zur beginnenden Primitivstreifenbildung in diesen In-Vitro-Modellen (Harrison et al. 2017), und über die Zellzahl lässt sich die Feinstrukturierung der im Primitivstreifen ablaufenden Gastrulationsvorgänge steuern (Kempf et al. 2016). Entwicklungsbiologisch muss man die dabei ablaufenden Vorgänge als Selbstorganisationsprozesse einstufen, also als Ausdruck einer Autonomie, da sie nicht auf externe Instruktionen zurückzuführen sind. Ein anderer Ansatz ist das planmäßige, aktive Eingreifen in Strukturbildungsvorgänge durch das Einbringen von Morphogen-Gradienten im Sinn eines Embryos-Engineerings, wie oben diskutiert. In Kombinationen beider Strategien können in Zukunft vermutlich mit Regelmäßigkeit so komplexe, weitgehend normal strukturierte Embryonalanlagen

(Embryonen) in vitro erzeugt werden (und nicht nur als kuriose »Ausreißer« zufällig einmal spontan entstehen, wie seinerzeit beim Weißbüscheläffchen beschrieben, s. Thomson et al. 1996).

Solche Forschungen werden uns in den nächsten Jahren helfen, besser zu verstehen, worin im Detail die entscheidenden Potentialitäts-relevanten Unterschiede zwischen einem frühen Embryo und einer undifferenzierten bzw. einer sich differenzierenden Stammzellkolonie (PPSC) liegen. Die Entwicklungsbiologie lässt aber durchaus heute schon einige Umriss des sich abzeichnenden Bildes erkennen (Denker 2004b). Was also ist eine Säugetier-Zygote oder Morula, im Gegensatz zu einer undifferenzierten Stammzellkolonie, und was steckt hinter ihrer Totipotenz? Wie schon in der Einleitung angesprochen, erfordert die geordnete Morphogenese Asymmetriesignale, die Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Anlageplans sind. In der normalen Embryogenese bringt die Zygote erste strukturierende Achsenvorgaben mit. Dies gilt nicht nur für Entwicklungsstrategien einiger Spezies niederer Tiere, die man früher als »Mosaiktyp« bezeichnete, sondern in weniger extremer Form auch für den Säugetierembryo: Obwohl der Säugetierembryo ein Beispiel für sehr ausgeprägte Regulationsbefähigung ist, scheint auch in diesem Fall die *Zygote* eine zytoplasmatische Architektur zu besitzen, die grundlegende Informationen für die Herausbildung der späteren Körperachsen, also für die Ordnung im Gefüge der sich später differenzierenden Zellen, liefert. Diese Vorgaben für die Achsen werden bei der Furchung und Blastozystenbildung durch geordnete Zellteilung an diese Folgestadien weitergegeben (Arbeiten von Gardner und Zernicka-Goetz, zitiert in Denker 2004b; Littwin and Denker 2011). Sie machen diese frühen Embryonen von externen Signalen für die Strukturentwicklung unabhängig (autonom). Beim Säugetier sind diese Asymmetrievorgaben vermutlich relativ trivialer Art, sind keine spezifischen Instruktionen für die Bildung bestimmter Zellarten (wie beim Mosaiktyp der Entwicklung), sondern sie betreffen zum Beispiel unterschiedliche Zellteilungsgeschwindigkeiten; daher können sie auch in den In-Vitro-Modellen durch Inhomogenitäten anderer Art ersetzt werden (Denker 2004b). Eine derartige Vor-Information für eine geordnete Realisierung eines Körpergrundplans muss Stammzellen, die in der In-Vitro-Kultur ständig passagiert werden (und ohnehin nicht so viel Zytoplasma besitzen wie eine Zygote), fehlen. Pluripotente/omnipotente (Denker 2006; Denker 2014) Stammzellen (PPSC) können zwar alle Zellarten des Körpers aus sich hervorgehen lassen, aber es fehlt der einzelnen Stammzelle das ordnende Prinzip für die Herausbildung der Körperachsen, der Körpergrundgestalt. Spätere Prozesse der Organogenese können von Stammzellen relativ leicht imitiert werden, wie wir aus der Organoidforschung wissen, besonders wenn diese Vorgänge sich auch im Embryo in einer speziellen Organ-Nische abspielen, die in vitro surrogatweise nachgebaut werden kann. Was den Grundbauplan

des Körpers anbelangt, so sind zwar die Prinzipien der Musterbildung nicht wesentlich anders, aber Organ-Nischen-Signale sind hier fehl am Platz. Wenn in Chimären-Experimenten PPSC dazu gebracht werden, Organ-Nischen zu besiedeln, so schlagen sie den Differenzierungsweg dieser Nischen ein (Matsunari et al. 2013). Was für die Verwirklichung der frühembryonalen Musterbildungspotenz einer totipotenten Entität (wie einer Morula oder Blastozyste) nötig ist, das ist, eine entwicklungsbiologisch neutrale, insofern schützende Umgebung zur Verfügung zu stellen, in der es keine Signale von außen gibt, die die Selbstorganisation einer Körpergrundgestalt stören könnten (wie es z. B. Organ-Nischen-Signale täten). Die Morula bringt von der Zygote herstammende einfache Asymmetriesignale mit; sie reichen aus, um den Körpergrundplan autonom entstehen zu lassen, eben sofern keine Störung von außen eintritt. Dieses in gewisser Weise schlichte Prinzip scheint der entwicklungsbiologischen Autonomie der frühen Säugetierembryonen zugrunde zu liegen. Abschirmung gegenüber dem, was an störenden Signalen (die es im Körper allenthalben gibt) möglich wäre, das ist es, was der Uterus in der Phase der Bildung der Körpergrundgestalt dem Embryo bieten muss: einen entwicklungsbiologischen Schutzschild, den kaum eine andere Region des Körpers zu bieten vermag, vielleicht vom Eileiter abgesehen, s. Tubenschwangerschaft. (Die Bedeutung des Uterus, die er in der nachfolgenden Phase für die Bildung einer funktionsfähigen Plazenta mit der essentiellen Blutversorgung hat, kann bei diesen Betrachtungen außen vor bleiben.)

Warum sollte man die entwicklungsbiologische Autonomie und insbesondere die Fähigkeit zur Bildung eines Körpergrundplans (»basic body plan«, Körpergrundgestalt) als Kriterium für eine ethische Bewertung des Umgangs mit frühembryonalen Entitäten (Embryoiden) nehmen und sogar (wie ich meine) diesem Aspekt ein höheres Gewicht beimessen als anderen Gesichtspunkten, etwa dem der Entstehungsbedingungen für embryonale Entitäten (Künstlichkeit vs. Natürlichkeit; vgl. 2.1)? Bezüglich der Forschung an menschlichen Embryonen hat man sich in vielen Ländern darauf festgelegt, in der Bildung des Primitivstreifens (Alter der Embryonen in vivo etwa 14 Tage) ein Entwicklungsstadium zu sehen, das als Grenze angesetzt wird, jenseits derer dem Embryo ein erheblich höherer Schutzanspruch zuzugestehen sei (Hyun et al. 2016). Diese Grenzsetzung geht auf die Empfehlungen der Warnock-Commission zurück, die die Grundlage für die gesetzlichen Regelungen in Großbritannien legten. Es lohnt sich, Details dieser Empfehlungen nachzulesen und ihre Vorgeschichte zu kennen (geschildert in Warnock 2001). Das 14-Tage-(Primitivstreifen)-Stadium zur Definition einer Grenze heranzuziehen, ist damals alles andere als willkürlich geschehen, sondern geht auf intensive Beratungen mit Fachleuten aus dem Bereich Biologie, insbesondere Anne McLaren, und auf heftige Debatten zurück. Mary Warnock fasst die Intentionen selbst unter der Motto-Frage »When does life begin?« zusam-

men: »What we were really asking was ›When, in the gradual development of the embryo do we begin to think of it as something that merits protection? What, at its various stages, is to be its moral status?« (Warnock 2001). Seit einer Reihe von Jahren ist im Zusammenhang mit der Rolle des Primitivstreifens ein Aphorismus von Lewis Wolpert in unzähligen Publikationen zitiert worden (auch z. B. im Vorwort zum Standardwerk über die Gastrulation, s. Stern 2004): »The most important event in our life is not birth, marriage, or death but gastrulation«. Tatsächlich sind die zellbiologischen Vorgänge, die im Primitivstreifen ablaufen, nicht nur für die Bildung der definitiven Keimblätter (definitives Ektoderm, Endoderm, Mesoderm) entscheidend, sondern der vordere Teil des Primitivstreifens, der Hensensche Knoten, ist auch der Organisator, auf dessen Funktionen die Realisierung des Körpergrundplans beruht. Ohne Organisator bilden die Zellen der Keimscheibe nur ein chaotisches Durcheinander der verschiedenen Keimblattzellen und ihrer Derivate (entsprechend einem Tumor, einem Teratom). Eine Verdopplung von Primitivstreifen und Organisator führt zur Bildung monozygoter Zwillinge; demnach sind diese Strukturen von zentraler Bedeutung für die Individuation (Denker 2004b; Denker 2015). Das Wolpertsche Diktum ist zwar heftig überzogen und sollte keineswegs dazu verführen, Entwicklungsstadien vor der Primitivstreifbildung zu Freiwild zu erklären, denn die Entwicklung ist ein Kontinuum, und die entwicklungsbiologische Autonomie, die die Prä-Primitivstreifstadien zeigen, ist ein starkes Argument für einen schon früher einsetzenden Schutzanspruch. Aber die große Beachtung, die die Primitivstreifenbildung und ihre Rolle für die Individuation gefunden hat, ist zweifellos prinzipiell berechtigt. In der Primitivstreifen-abhängigen Verwirklichung des Körpergrundplans dokumentiert sich eine eminente integrative Funktion, eine zentrale Rolle in der Festlegung der Körperachsen und der inneren Ordnung der Organanlagen (Körpergrundplan). An diesem Punkt geschieht sozusagen die Kiellegung für die geordnete Entwicklung der organismischen Ganzheit in der Form, in der wir sie vom adulten Lebewesen kennen. Das ist seinerzeit auch schon von der Warnock-Commission so gesehen worden. Um so befremdlicher muss es nach alledem erscheinen, dass kürzlich nur mit dem Argument, dass man wegen einer neu entwickelten Technologie Chancen für experimentelle Untersuchungen über Embryogenese beim Menschen in großem Maßstab sieht, für eine Abkehr von der 14-Tage-(Primitivstreifen-)-Regelung votiert worden ist (Hyun et al. 2016; Reardon 2016; Rossant 2016). Dies wirft zwangsläufig die Frage nach der Ernsthaftigkeit der zuvor vorgetragenen Argumentationen und/oder dem Gewicht der jetzt betonten Gründe auf.

4. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Zygote stellt für die Embryonalentwicklung Achsen-Vorinformationen bereit, die zwar systembiologisch sehr einfacher Art sind, aber eine Unabhängigkeit von äußeren strukturierenden Signalen (morphogenetische Autonomie) mit sich bringen. Sie werden der Morula und Blastozyste weitergegeben und haben dort eine Bedeutung für die Elaboration der Achsensysteme des zukünftigen Organismus; sie sind Grundlage für Unabhängigkeit der Morphogenese dieser frühen Embryonen von externen strukturierenden Signalen. Eine Besonderheit frühembryonaler Zellen (einer Morula, des Embryoblasten) besteht darin, dass sie die Fähigkeit besitzen, aus den einfachen vorgegebenen Asymmetrien im Rahmen der einsetzenden Kaskade von Zelldifferenzierungen, Zellbewegungen und Signalaustauschvorgängen die definitiven Körperachsen als Grundlage für die Körpergrundgestalt zu modellieren (Selbstorganisation). Die Morphogenese des frühembryonalen Systems ist sehr flexibel und gestattet umfangreiche Regulationen. Die Kaskaden der Morphogenesevorgänge laufen in den Embryonen zwar grundsätzlich autonom ab und benötigen keine externen Instruktionen (etwa vonseiten des Uterus), aber sie können sich nur in einer schützenden (morphogenetisch neutralen) Umgebung entfalten, da sie von außen beeinflussbar (störbar) sind, insbesondere durch Interaktionen mit Fremdzellen.

Undifferenzierte PPSC sind keine Embryonen; sie besitzen keine Asymmetrievorgaben, die (vergleichbar der Zygote) eine entwicklungsbiologische Autonomie vermitteln könnten. Gruppen/Kolonien von PPSC können allerdings als Neuerwerbung einen Autonomiegrad erreichen, der im Rahmen einer Selbstorganisation frühembryonale Musterbildungsprozesse in Gang setzt. Für den Start einer solchen geordneten Morphogenese genügen einfache Asymmetrien, die sich in Kulturen sogar stochastisch ergeben können, doch sind diese Prozesse sehr störanfällig, und ihr geordneter Fortgang ist daher ein seltenes Ereignis. Durch neuentwickelte Verfahren zur Optimierung der biophysikalischen Bedingungen ist es allerdings jetzt möglich geworden, in Säugetierstammzellkulturen eine geordnete Morphogenese von frühen Embryonalanlagen regelmäßig zu erreichen.

Im Hinblick auf ethische Implikationen ist es wichtig festzuhalten, dass, wie diese Experimente zeigen, Gruppen von »pluripotenten« Stammzellen nicht nur zur Bildung von »Organoiden« sondern auch zur autonomen frühembryonalen Musterbildung (Selbstorganisation) in sehr viel ausgeprägterem Maß fähig sind, als früher angenommen wurde. Dies schließt Prozesse ein, die in der normalen Embryogenese zur Bildung der Körpergrundgestalt (Primitivstreifen usw.) führen (»Gastruloide«). Eine Optimierung der Bedingungen für die Selbstorganisation in Stammzellkolonien führt zu einer weitgehenden Angleichung an die normale Embryonalentwicklung und wird

von einigen Untersucherguppen systematisch beforscht. Es gibt hier fließende Übergänge zu einem »Embryo-Engineering« aus Stammzellen (das in diesen Fällen ohne fremde Hilfszellen wie etwa bei der TK durchgeführt wird); in diesen Experimenten wird wie berichtet bereits das Stadium der Primitivstreifenbildung erreicht. Damit scheinen die Bildung einer Körpergrundgestalt und der Erwerb einer prinzipiellen Lebensfähigkeit als Organismus in solchen In-Vitro-Modellen durchaus möglich.

Solche Versuche zur »Optimierung« der frühembryonalen Musterbildungsprozesse in Gruppen menschlicher pluripotenter Stammzellen sind ethisch hochproblematisch, da dies die Prozesse sind, bei denen die Bildung der Körpergrundgestalt (basic body plan; Individuation!) einsetzt. In bisherigen gesetzlichen Regelungen für den Umgang mit menschlichen Embryonen ist dem Erreichen des Primitivstreifenstadiums wegen seiner Bedeutung für die Individuation ein besonderes Gewicht (im Sinn einer ethischen Grenze) beigemessen worden (14-Tage-Regel, z. B. britische Gesetzgebung, Empfehlungen der Warnock-Commission). Der hohe Grad an entwicklungsbiologischer Autonomie, den die aus Stammzellen hergestellten embryoiden Konstrukte (Embryonen) in den diskutierten neuen Untersuchungen zeigen, kann nur Anlass dazu geben, über eine Vor-Verlagerung, nicht aber über ein Hinausschieben der Grenze (auf spätere Stadien) für Forschungen an menschlichen Embryonen und Stammzellerivaten nachzudenken: Aus der Beobachtung eines höheren Maßes an Autonomie kann logischerweise nicht die Forderung nach einem geringeren Maß an Würde/Schutzanspruch, sondern höchstens nach einem höheren Maß davon hergeleitet werden. Statt die 14-Tage-Grenze für Versuche an menschlichen Embryonen (UK) fallen zu lassen (wie aufgrund von Versuchen mit menschlichen Blastozysten in vitro kürzlich gefordert wurde), zwingen diese Fakten eher zur Forderung, dass der Homo faber/ludens sich in Zukunft hier engere Grenzen setzt (Denker 2014; Pera et al. 2015). Als schutzwürdig sollte eine menschliche Entität (Zygote, frühe Blastomere, aber auch eine mit der Selbstorganisation beginnende Gruppe von »pluripotenten«/omnipotenten Stammzellen, ein »Gastruloid«, ein embryoides Konstrukt) immer dann angesehen werden, wenn sie systembiologisch gesehen eine funktionelle Ganzheit embryonalen Typs besitzt, die bei Vorliegen geeigneter Rahmenbedingungen die autonome Entwicklung einer Körpergrundgestalt ermöglicht.

In der Forschung sollte man alle Untersuchungen zur frühembryonalen Selbstorganisation und Versuche zum Embryo-Engineering, die die Möglichkeit der Entstehung eines Körpergrundplans zum Ziel haben oder zumindest diese Möglichkeit einschließen, aus ethischen Gründen auf Modellversuche an nicht-menschlichen Zellen beschränken. Zur Annäherung an die Situation beim Menschen kann man Stammzellen von nicht-menschlichen Primaten einsetzen.

NACHTRAG BEI DER DRUCKLEGUNG

Inzwischen ist, wie zu erwarten war, die Forschung über die Erzeugung Embryonen-ähnlicher Gebilde aus hPPSC weiter vorangeschritten und legt immer eindrucksvollere Befunde vor (Shao et al 2017). Als Konsequenz daraus melden sich nun auch kritische Stimmen. So hat die Gruppe von George M. Church (Harvard University) sich in einem groß aufgemachten Artikel in eLife der ethischen Problematik, die die Versuche zur Herstellung »synthetischer« menschlicher Embryonen aufwerfen, angenommen (Aach et al. 2017). Diese Autoren schlagen zur Bezeichnung solcher Konstrukte einen neuen Begriff vor: »SHEEFs (Synthetic Human Entities with Embryo-like Features)«; sie sprechen allerdings auch die Möglichkeit an, dass solche Konstrukte volle Entwicklungsfähigkeit erreichen könnten, so dass man sie zu Recht als »Synthetic Embryos« bezeichnen könnte. Aufbauend auf meiner Argumentation (Denker 2014) und der von Pera et al. (Pera et al. 2015) rufen Aach et al. dazu auf, dass eine breite Diskussion über den Umgang mit dieser Problematik gestartet wird und dass einschlägige Organisationen ein verbindliches ethisches Regelwerk erarbeiten sollen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aach J., Lunshof J., Iyer E. & Church G. M. (2017) Addressing the ethical issues raised by synthetic human entities with embryo-like features. eLIFE 6:e20674.
- Barney J. (2014) U.Va. Smashes Barrier to Growing Organs from Stem Cells. In: UVA Today: University of Virginia, <https://news.virginia.edu/content/uva-smashes-barrier-growing-organs-stem-cells> (04.10.2017).
- Behr R., Heneweer C., Viebahn C., Denker H. W. & Thie M. (2005) Epithelial-mesenchymal transition in colonies of rhesus monkey embryonic stem cells: a model for processes involved in gastrulation. Stem Cells 23:805–816.
- Beier H. M. (2001) Zur Problematik von Totipotenz und Pluripotenz. In: Humane Stammzellen (Bundesministerium für Bildung und Forschung, ed), pp 55–70. Stuttgart, New York: Schattauer.
- Clevers H. (2016) Modeling Development and Disease with Organoids. Cell 165:1586–1597.
- Deglincerti A., Croft G. F., Pietila L. N., Zernicka-Goetz M., Siggia E. D. & Brivanlou A. H. (2016a) Self-organization of the in vitro attached human embryo. Nature 533: 251–254.
- Deglincerti A., Etoc F., Guerra M. C., Martyn I., Metzger J., Ruzo A., Simunovic M., Yoney A., Brivanlou A. H., Siggia E. & Warmflash A. (2016b) Self-organization of human embryonic stem cells on micropatterns. Nat Protoc 11:2223–2232.

- Denker H.-W. (1999) Embryonic stem cells: An exciting field for basic research and tissue engineering, but also an ethical dilemma? *Cells Tissues Organs* 165:246–249.
- Denker H.-W. (2002) Forschung an embryonalen Stammzellen: Eine Diskussion der Begriffe Totipotenz und Pluripotenz. In: *Stammzellenforschung und therapeutisches Klonen* (Oduncu F, Schroth U, Vossenkuhl W, eds), pp 19–35. Göttingen: Vandenhoeck und Ruprecht.
- Denker H.-W. (2004a) Die Potenz von menschlichen ES-Zellen als Argument gegen ihre Patentierbarkeit. In: *Jahrbuch für Wissenschaft und Ethik* (Honnefelder L, Streffer C, eds), vol 9, pp 367–371. Berlin – New York: de Gruyter.
- Denker H.-W. (2004b) Early human development: new data raise important embryological and ethical questions relevant for stem cell research. *Naturwissenschaften* 91:1–21.
- Denker H.-W. (2006) Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources. *J Med Ethics* 32:665–671.
- Denker H.-W. (2008) Totipotency/pluripotency and patentability. *Stem Cells* 26:1656–1657.
- Denker H.-W. (2009a) Ethical concerns over use of new cloning technique in humans. *Nature* 461:341.
- Denker H.-W. (2009b) Induced pluripotent stem cells: how to deal with the developmental potential. *Reprod Biomed Online* 19 Suppl 1:34–37.
- Denker H.-W. (2014) Stem cell terminology and ›synthetic‹ embryos: a new debate on totipotency, omnipotency, and pluripotency and how it relates to recent experimental data. *Cells Tissues Organs* 199:221–227.
- Denker H.-W. (2015) Comment on G. Herranz: The timing of monozygotic twinning: a criticism of the common model. *Zygote* (2013). *Zygote* 23:312–314.
- Denker H.-W. (2016) Self-Organization of Stem Cell Colonies and of Early Mammalian Embryos: Recent Experiments Shed New Light on the Role of Autonomy vs. External Instructions in Basic Body Plan Development. *Cells* 5:E39.
- EMBO/EMBL (2016) Symposium ›Organoids: Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture‹, Heidelberg, 12.–15. Oktober 2016. <https://www.embo-embl-symposia.org/symposia/2016/EES16-07/programme1/index.html> (04.10.2017).
- Etoc F, Metzger J., Ruzo A., Kirst C., Yoney A., Ozair M. Z., Brivanlou A. H. & Siggia E. D. (2016) A Balance between Secreted Inhibitors and Edge Sensing Controls Gastruloid Self-Organization. *Dev Cell* 39: 302–315.
- Gilbert S. F. (2014) *Developmental Biology*, ed 10th. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Harrison S. E., Sozen B., Christodoulou N., Kyprianou C. & Zernicka-Goetz M. (2017) Assembly of embryonic and extra-embryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. *Science* 356: pii: eaal1810.

- Heinemann T., Dederer H.-G. & Cantz T. (2016) Totipotente Nicht-Embryonen und nicht-totipotente Embryonen. Normative Herausforderungen durch artifizielle Entitäten. In: ELSA-Forschungsverbundprojekt »Entwicklungsbiologische Totipotenz: Bestimmung als normatives Kriterium in Ethik und Recht unter Berücksichtigung neuer entwicklungsbiologischer Erkenntnisse« (Verlängerung). Interdisziplinäres Symposium, 12.–13. September 2016 in der Medizinischen Hochschule Hannover. <http://www.gscn.org/Portals/0/Conferences/2016/Documents/Totipotente%20Embryonen%202016-Endfassung.pdf> (04.10.2017).
- Hyun I., Wilkerson A. & Johnston J. (2016) Embryology policy: Revisit the 14-day rule. *Nature* 533:169–171.
- Kempf H., Olmer R., Haase A., Franke A., Bolesani E., Schwanke K., Robles-Diaz D., Coffee M., Gohring G., Drager G., Potz O., Joos T., Martinez-Hackert E., Haverich A., Buettner F. F., Martin U. & Zweigerdt R. (2016) Bulk cell density and Wnt/TGFbeta signalling regulate mesendodermal patterning of human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 7:13602.
- Kojima J., Fukuda A., Taira H., Kawasaki T., Ito H., Kuji N., Isaka K., Umezawa A. & Akutsu H. (2017) Efficient production of trophoblast lineage cells from human induced pluripotent stem cells. *Lab Invest* 97: 1188–1200
- Little M. H. (2016) Closing the circle: from organoids back to development. *Development* 143:905–906.
- Little M. H. (ed) (2017) Organoids. *Development* 144(6; Special Issue). The Company of Biologists. <http://dev.biologists.org/content/144/6> (04.10.2017).
- Littwin T. & Denker H.-W. (2011) Segregation during cleavage in the mammalian embryo? A critical comparison of whole-mount/CLSM and section immunohistochemistry casts doubts on segregation of axis-relevant leptin domains in the rabbit. *Histochem Cell Biol* 135:553–570.
- Lo B., Parham L., Alvarez-Buylla A., Cedars M., Conklin B., Fisher S., Gates E., Giudice L., Halme D. G., Hershon W., Kriegstein A., Kwok P. Y. & Wagner R. (2010) Cloning mice and men: prohibiting the use of iPS cells for human reproductive cloning. *Cell Stem Cell* 6:16–20.
- Maranca-Hüwel B. & Denker H.-W. (2010) Epithelial-mesenchymal transition in rhesus monkey embryonic stem cell colonies: the role of culturing conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46:516–528.
- Matsunari H., Nagashima H., Watanabe M., Umeyama K., Nakano K., Nagaya M., Kobayashi T., Yamaguchi T., Sumazaki R., Herzenberg L. A. & Nakauchi H. (2013) Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apantretic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4557–4562.
- Nagy A., Gocza E., Diaz E. M., Prideaux V. R., Ivanyi E., Markkula M. & Rossant J. (1990) Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110:815–821.
- Nagy A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J. C. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 90:8424–8428.

- Pera M. F., de Wert G., Dondorp W., Lovell-Badge R., Mummery C. L., Munsie M. & Tam P. P. (2015) What if stem cells turn into embryos in a dish? *Nat Methods* 12:917–919.
- Poh Y. C., Chen J., Hong Y., Yi H., Zhang S., Chen J., Wu D. C., Wang L., Jia Q., Singh R., Yao W., Tan Y., Tajik A., Tanaka T. S. & Wang N. (2014) Generation of organized germ layers from a single mouse embryonic stem cell. *Nat Commun* 5:4000.
- Reardon S. (2016) Human embryos grown in lab for longest time ever. Embryos cultured for up to 13 days after fertilization open a window into early development. *Nature* 533:15–16.
- Rossant J. (2016) Human embryology: Implantation barrier overcome. *Nature* 533: 182–183.
- Seidel F. (1960) Körpergrundgestalt und Keimstruktur. Eine Erörterung über die Grundlagen der vergleichenden und experimentellen Embryologie und deren Gültigkeit bei phylogenetischen Überlegungen. *Zool Anz* 164:245–305.
- Shahbazi M. N., Jedrusik A., Vuoristo S., Recher G., Hupalowska A., Bolton V., Fogarty N. M., Campbell A., Devito L. G., Ilic D., Khalaf Y., Niakan K. K., Fishel S. & Zernicka-Goetz M. (2016) Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol* 18: 700–708.
- Shao Y., Taniguchi K., Townshend R.F., Miki T., Gumucio D.L., Fu J (2017) A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development. *Nat Commun* 8: 208.
- Stern C. D. (2004) *Gastrulation – From cells to embryo*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stier M. & Schoene-Seifert B. (2013) The argument from potentiality in the embryo protection debate: finally »depotentialized«? *Am J Bioeth* 13:19–27.
- ten Berge D., Koole W., Fuerer C., Fish M., Eroglu E. & Nusse R. (2008) Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell* 3:508–518.
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. (1998) Embryonic Stem Cell Lines Derived From Human Blastocysts. *Science* 282:1145–1147.
- Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P. & Hearn J. P. (1996) Pluripotent Cell Lines Derived from Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Blastocysts. *Biol. Reprod.* 55:254–259.
- van den Brink S. C., Baillie-Johnson P., Balayo T., Hadjantonakis A. K., Nowotzschin S., Turner D. A. & Martinez Arias A. (2014) Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells. *Development* 141:4231–4242.
- Warmflash A. (2014) Towards a synthetic embryo. In: *The NODE – the community site for and by developmental biologists*. (The Company of Biologists, ed.) <http://thenode.biologists.com/towards-a-synthetic-embryo/research/> (05.10.2017).

- Warmflash A., Sorre B., Etoc F., Siggia E. D. & Brivanlou A. H. (2014) A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nat Methods* 11:847–854.
- Warnock M. (2001) Anne McLaren as teacher. *Int J Dev Biol* 45:487–490.
- Wiley L. M. & Pedersen R. A. (1977) Morphology of mouse egg cylinder development in vitro: a light and electron microscopic study. *J Exp Zool* 200:389–402.
- Willyard C. (2015) Rise of the organoids. Biologists are building banks of mini-organs, and learning a lot about human development on the way. *Nature* 523:520–522.
- Xu P. F., Houssin N., Ferri-Lagneau K. F., Thisse B. & Thisse C. (2014) Construction of a vertebrate embryo from two opposing morphogen gradients. *Science* 344:87–89.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BMP	Bone Morphogenetic Protein
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ESC	embryonale Stammzelle(n)
hESC	humane (menschliche) embryonale Stammzelle(n)
hiPSC	humane (menschliche) induzierte pluripotente Stammzelle(n)
ICM	innere Zellmasse (Embryoblast, inner cell mass)
iPSC	induzierte pluripotente Stammzelle(n)
mESC	murine embryonale Stammzelle(n) (Maus)
mTSC	murine Trophoblast-Stammzelle(n) (Maus)
PGC	primordiale Keimzelle(n) (primordial germ cells)
PPSC	pluripotente Stammzelle(n)
TK	tetraploide Komplementierung
TSC	Trophoblast-Stammzelle(n)