

Embryonen und Embryoide:
Gedanken eines Entwicklungsbiologen zu
ethischen Implikationen von Autonomie und
Machbarkeit

Hans-Werner Denker
Institut für Anatomie
Universität Duisburg-Essen
Universitätsklinikum

5. November 2016

"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt

Motto

‘Entwicklung ist Umbildung
von einer Gestalt zur anderen’

(Seidel, 1960, nach Carl Ernst von Baer)

[Seidel, F. Körpergrundgestalt und Keimstruktur. Eine Erörterung über die Grundlagen der vergleichenden und experimentellen Embryologie und deren Gültigkeit bei phylogenetischen Überlegungen. *Zool Anz* 164: 245–305 (1960)]

Konferenzen der letzten Monate

EMBO | EMBL Symposium

Organoids

Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture

12 – 15 October 2016 | EMBL Advanced Training Centre | Heidelberg | Germany

#EESOrgan

5. November 2016

ELSA-Forschungsverbundprojekt
„Entwicklungsbiologische Totipotenz: Bestimmung als normatives Kriterium in Ethik und Recht unter Berücksichtigung neuer entwicklungsbiologischer Erkenntnisse“ (Verlängerung)

Totipotente Nicht-Embryonen und nicht-totipotente Embryonen

Normative Herausforderungen durch artifizielle Entitäten

Interdisziplinäres Symposium

12. – 13. September 2016
in der Medizinischen Hochschule Hannover

GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium für Bildung und Forschung

In Kooperation mit dem German Stem Cell Network (GSCN) im Rahmen der Jahrestagung 2016 (www.gscn.org)

GermanStemCellNetwork

"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt

Selbstorganisation

(aktive Potenz)

Natürlichkeit
Künstlichkeit
Machbarkeit

Topics

- Autonomie vs. Heteronomie
- „Selbst-Organisation“ von **Blastozysten**
- Bildung der Körpergrundgestalt (Basic Body Plan); Primitivstreifen
- Was ist ein früher Säugetierembryo?
- Selbstorganisation von **Stammzellkolonien**
- (Chimären; tetraploide Komplementierung)
- Embryoid Bodies
- „Gastruloide“

“Denker argues that he is not advancing a particular philosophy but merely sticking to biological fact.

In my view, it is impossible to derive any kind of ethics from biological fact.”

(Kommentar eines anonymen Gutachters, 2016)

Carl Friedrich von Weizsäcker:

“Naturwissenschaftliche Wahrheit ist immer
schlicht.“

Autonomie vs. Heteronomie:
Argumentative Bastionen, die aufgrund neuer
experimenteller Daten zunehmend fallen, sind
folgende Annahmen:

- Frühe Säugetierembryonen sollen wenig/keine Autonomie besitzen, vielmehr seien sie auf externe Informationen für ihre Morphogenese angewiesen („Zell-Haufen“).
- Kolonien von „pluripotenten“ Stammzellen seien zwar zur Bildung aller Zellarten des Körpers befähigt, aber nicht zur autonomen Bildung einer Körpergrundgestalt (Primitivstreifbildung, geordnete Gastrulation)

Autonomie/Heteronomie von Präimplantationsstadien (Morulae, Blastozysten)

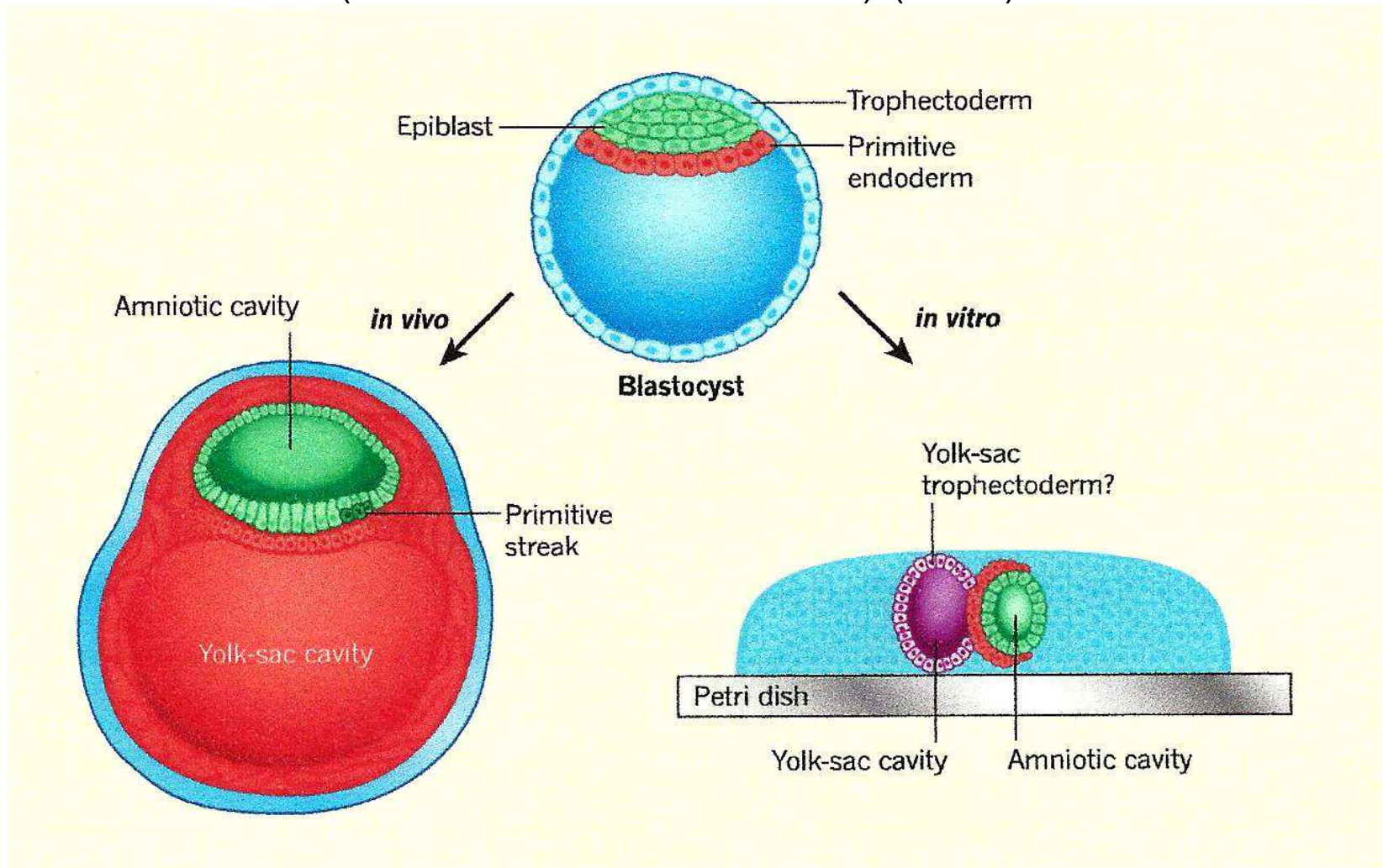
Abhängigkeit der Fortsetzung der
Morphogenese in Post-Blastozystenstadien
von der **Implantation** im Uterus?

Selbst-Organisation menschlicher Blastozysten

Unabhängigkeit vom Uterus

- Deglincerti, A. ... Brivanlou, A.H.: Self-organization of the *in vitro* attached human embryo. *Nature* 533(7602):251-4 (doi: 10.1038/nature17948) (2016).
- Shahbazi, M.N. ... Zernicka-Goetz, M.: Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nature Cell Biol.* 18(6):700-8 (doi: 10.1038/ncb3347) (2016).
- Rosssant, J.: Implantation barrier overcome. *Nature* 533(7602):182-3 (doi: 10.1038/nature17894) (2016).
- Reardon, S.: 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(7602):15-16 (2016)
- Hyun, I., Wikerson, A. & Johnston, J.: Embryology policy: Revisit the 14-day rule. *Nature* 533(7602): 169-171 (doi:10.1038/533169a) (2016).

Rosssant, J.: Implantation barrier overcome. *Nature* 533(7602):182-3 (doi: 10.1038/nature17894) (2016).



5. November 2016

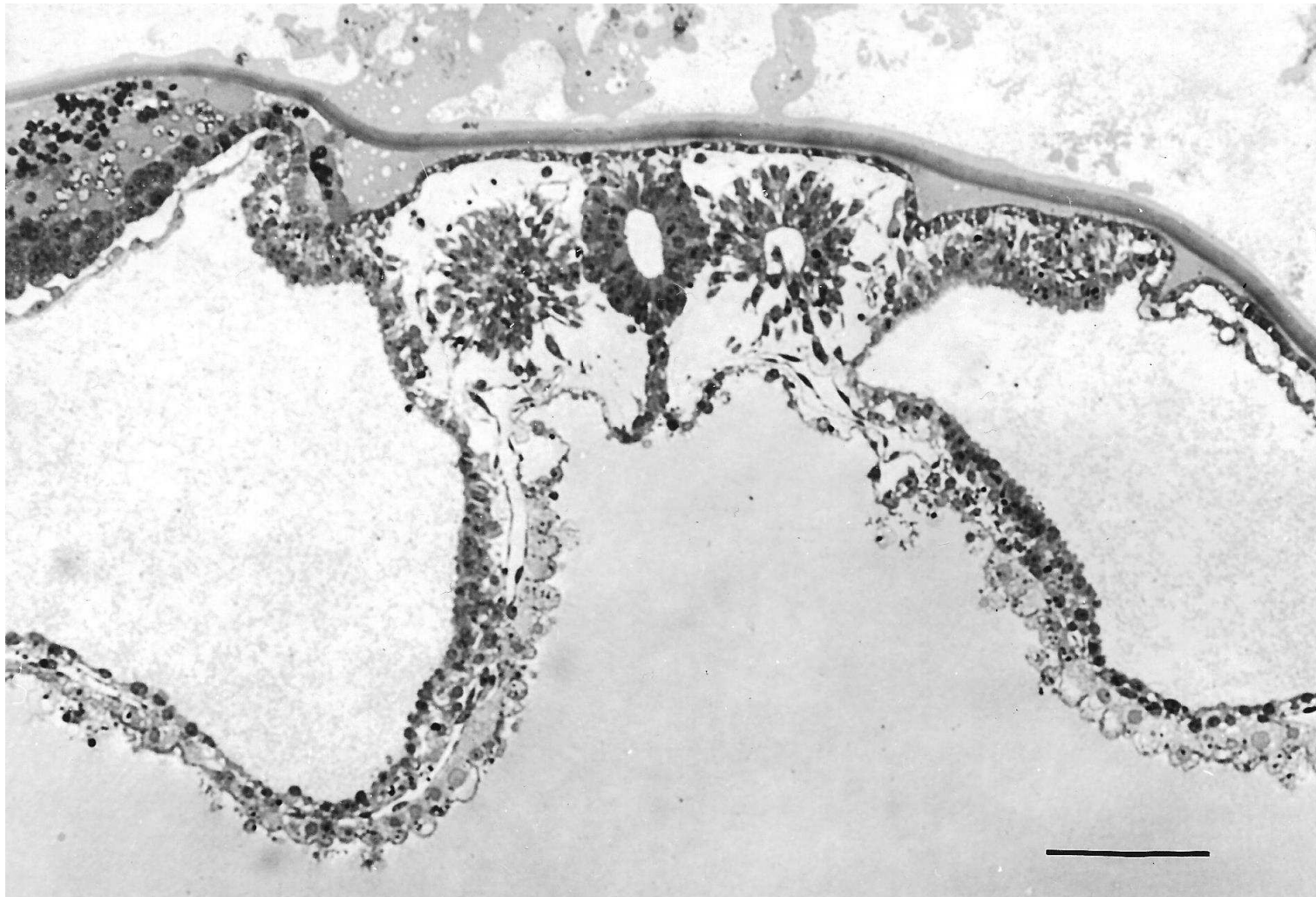
"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt

Körpergrundgestalt: Unabhängigkeit von der Implantation



Hemmung der Implantation der Blastozyste durch Aprotinin-Applikation in vivo beim Kaninchen. Der Embryo hat eine normale Körpergrundgestalt entwickelt (Neuralrohr, Somiten usw.) trotz Verhinderung der Einnistung im Uterus.

(Meinshausen, E. & Denker, H.-W.: Verh. Anat. Ges. 77, Anat. Anz. Suppl. 154, 421-423, 1983)



Denker & Meinshausen 1982

5. November 2016

"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt

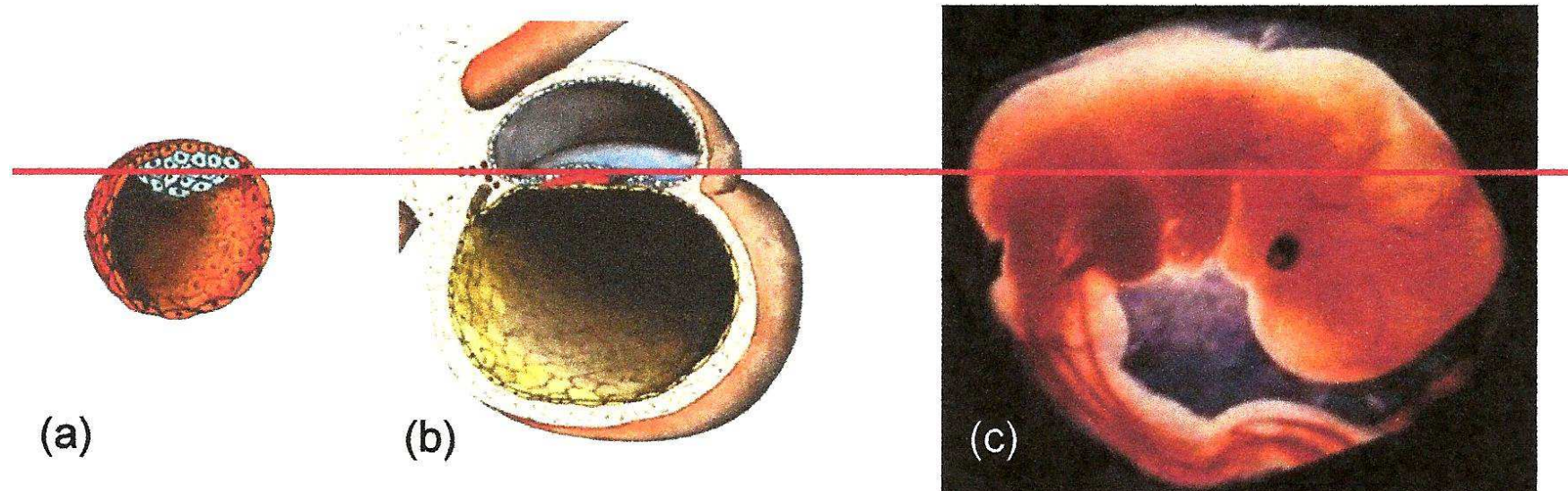
Autonomie vs. Heteronomie

Körpergrundgestalt-Bildung
(Basic Body Plan)
Primitivstreifen/Gastrulation

Körpergrundgestalt-Bildung (Basic Body Plan) Primitivstreifen/Gastrulation

“The most important event in our life
is not birth, marriage, or death but
gastrulation”
(Lewis Wolpert)

Körpergrundgestalt-Bildung

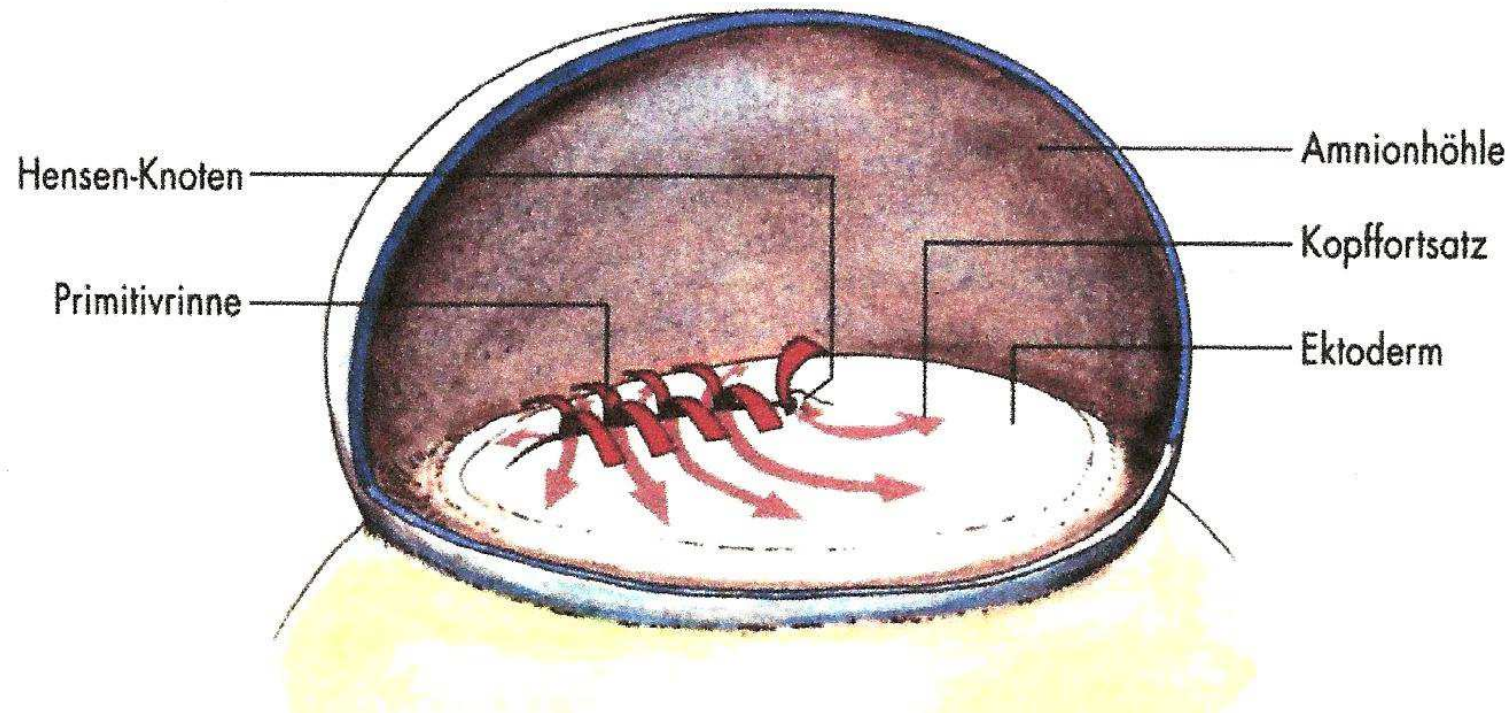


Littwin 2008

5. November 2016

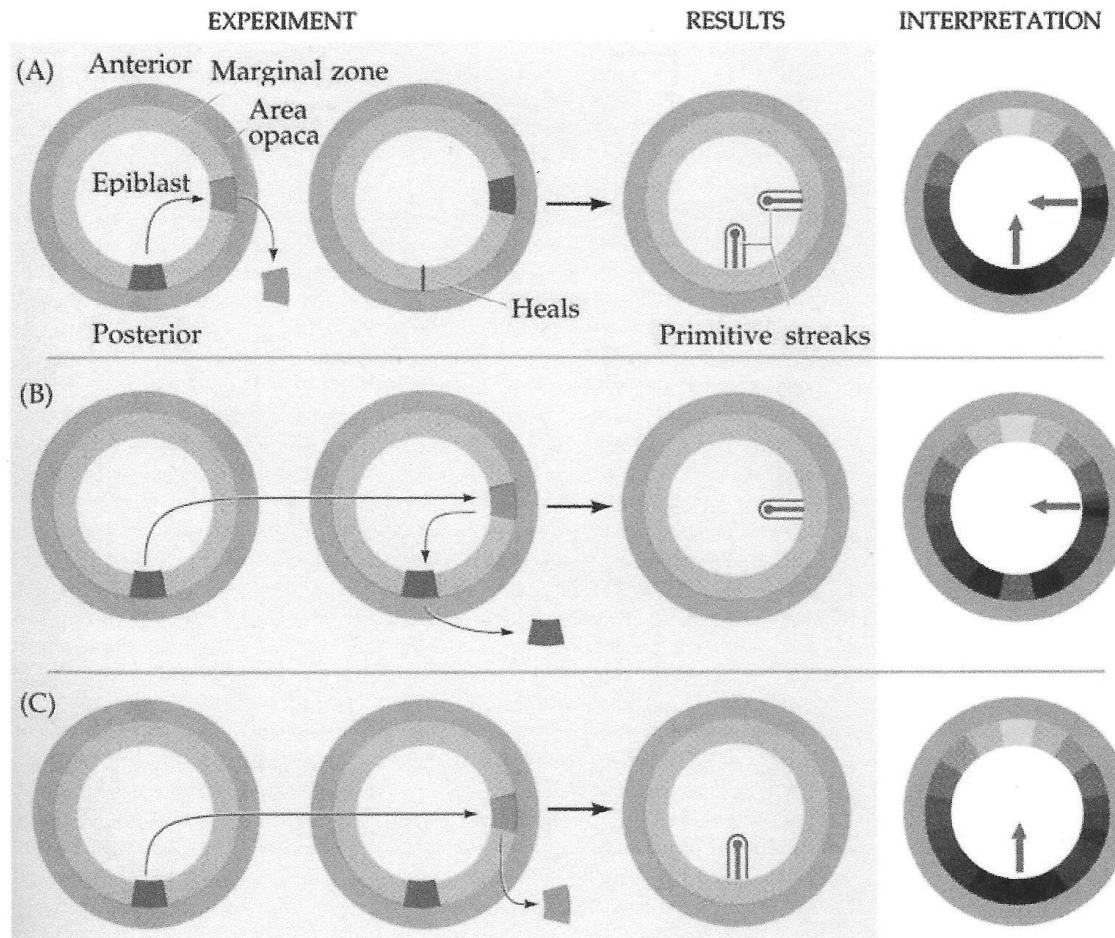
"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt

Körpergrundgestalt-Bildung: Bildung der Keimblätter und Körperachsen im Primitivstreifen (Gastrulation)



Littwin 2008 (nach Rohen 2002)

Experimentelle Induktion von Primitivstreifen (auch in Mehrzahl) in der Keimscheibe beim Hühnchen



(Experimente nach Khaner & Eyal-Giladi;
aus: Denker, H.-W.:
Naturwissenschaften 91, 1-21,
2004)

Stammzellkolonien: Selbstorganisation Engineering

Autonomie / Heteronomie

Organismische Ganzheit
Holismus

Experimente zur Induktion und Manipulation von Musterbildung und Gastrulationsvorgängen in Kolonien menschlicher Stammzellen

A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells

Aryeh Warmflash¹⁻³, Benoit Sorre¹⁻³, Fred Etoc^{1,2}, Eric D Siggia¹ & Ali H Brivanlou²

Embryos allocate cells to the three germ layers in a spatially ordered sequence. Human embryonic stem cells (hESCs) can generate the three germ layers in culture; however, differentiation is typically heterogeneous and spatially disordered. We show that geometric confinement is sufficient to trigger self-organized patterning in hESCs. In response to BMP4, colonies reproducibly differentiated to an outer trophoderm-like ring, an inner ectodermal circle and a ring of mesendoderm expressing primitive-streak markers in between. Fates were defined relative to the boundary with a fixed length scale: small colonies corresponded to the outer layers of larger ones. Inhibitory signals limited the range of BMP4 signaling to the colony edge and induced a gradient of Activin-Nodal signaling that patterned mesendodermal fates. These results demonstrate that the intrinsic tendency of stem cells to make patterns can be harnessed by controlling colony geometries and provide a quantitative assay for studying paracrine signaling in early development.

Nature Methods **11**: 847-854 (2014)
doi:10.1038/nmeth.3016

„Engineering“ von zellulären Prozessen der
Primitivstreifbildung in menschlichen ES-Zellkulturen
Warmflash et al.: Nature Methods **11**, 847-854 (2014)

- “...an outer trophectoderm-like ring, an inner ectodermal circle and a ring of mesendoderm expressing **primitive-streak** markers in between”.
- Resulting geometry dependent on the boundary, i.e., on physical constraints, as demonstrated impressively by culturing on various micro-patterned surfaces.
- The authors concluded that their observations demonstrate “**an intrinsic tendency of stem cells to make patterns**”,
- that this “can be harnessed by controlling colony geometries”,
- and that “**geometric confinement . . . [is] sufficient to trigger self-organized patterning in hESCs**”, under their culturing conditions.

What if stem cells turn into embryos in a dish?

Martin F Pera, Guido de Wert, Wybo Dondorp, Robin Lovell-Badge, Christine L Mummery, Megan Munsie & Patrick P Tam

Recent studies show that pluripotent stem cells can undergo self-organized development *in vitro* into structures that mimic the body plan of the post-implantation embryo. Modeling human embryogenesis in a dish opens up new possibilities for the study of early development and developmental disorders, but it may also raise substantial ethical concerns.

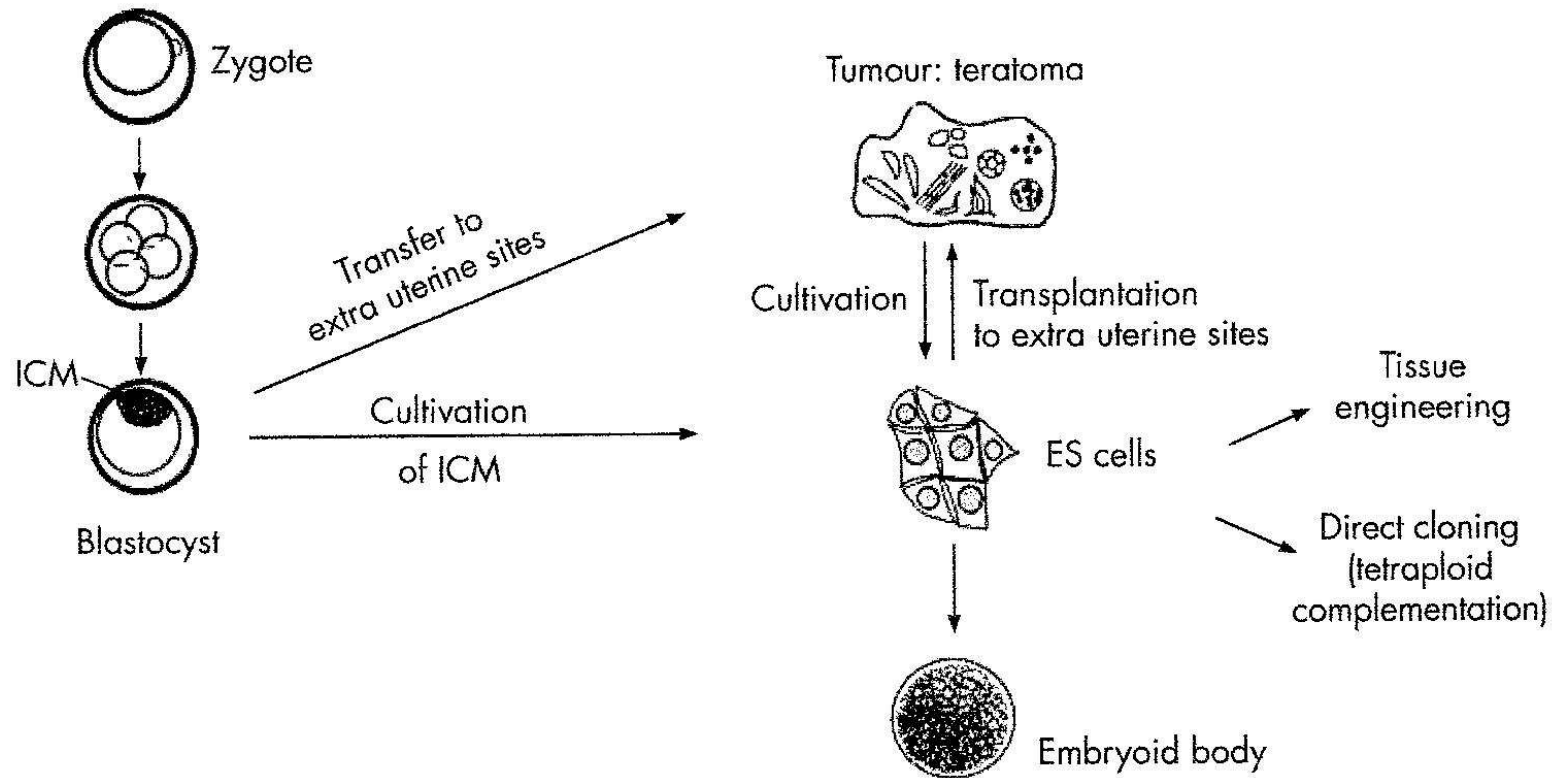
Nature Methods **12**(10), 917-919 (2015) (doi: 10.1038/nmeth.3586)

Autonomie vs. Heteronomie

5. November 2016

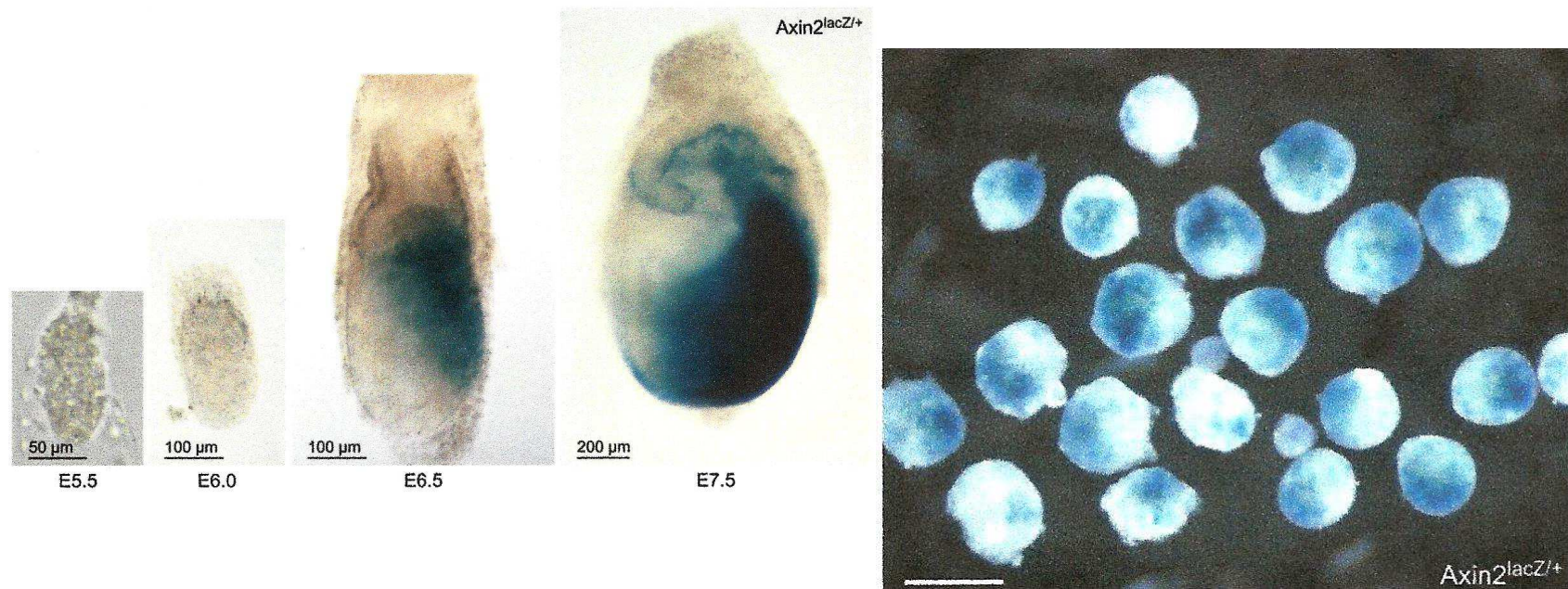
"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt

Differenzierungsmöglichkeiten von frühen Embryonen und ES-Zellen: Embryoid Bodies



Wnt Signaling Mediates Self-Organization and Axis Formation in Embryoid Bodies

ten Berge, D et al.: Cell Stem Cell **3**, 508–518 (2008) (doi:10.1016/j.stem.2008.09.013)



5. November 2016

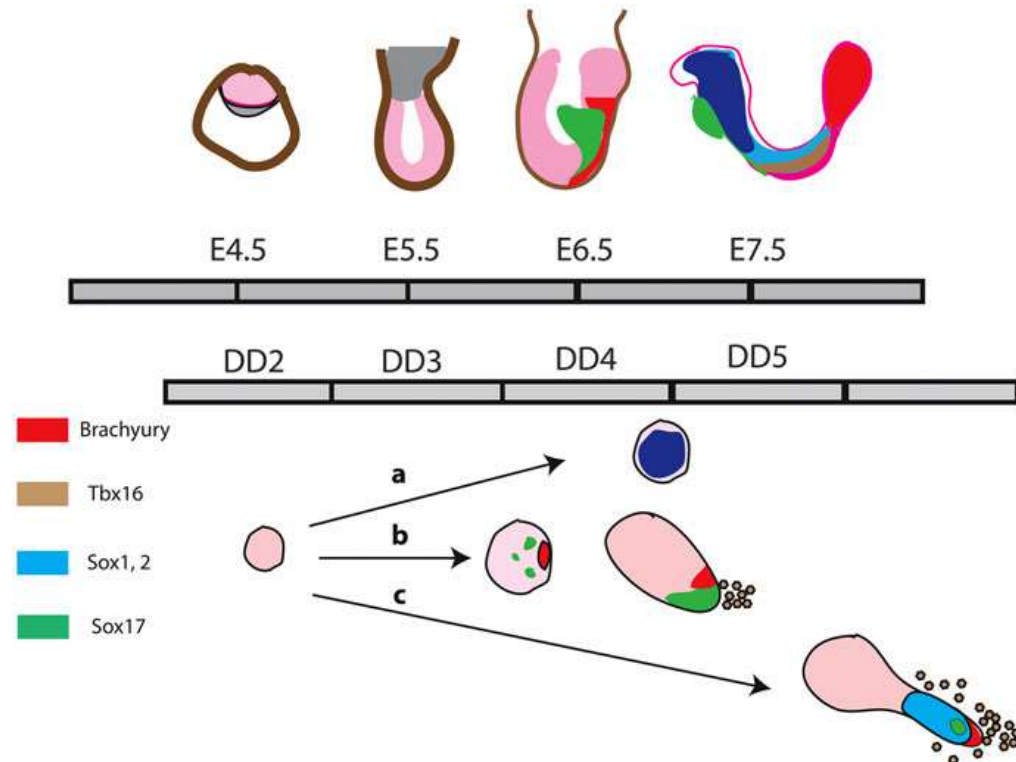
"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt

RESEARCH ARTICLE

STEM CELLS AND REGENERATION

Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells

Susanne C. van den Brink^{1,*}, Peter Baillie-Johnson^{1,*}, Tina Balayo¹, Anna-Katerina Hadjantonakis², Sonja Nowotschin², David A. Turner¹ and Alfonso Martinez Arias^{1,‡}



5. November 2016

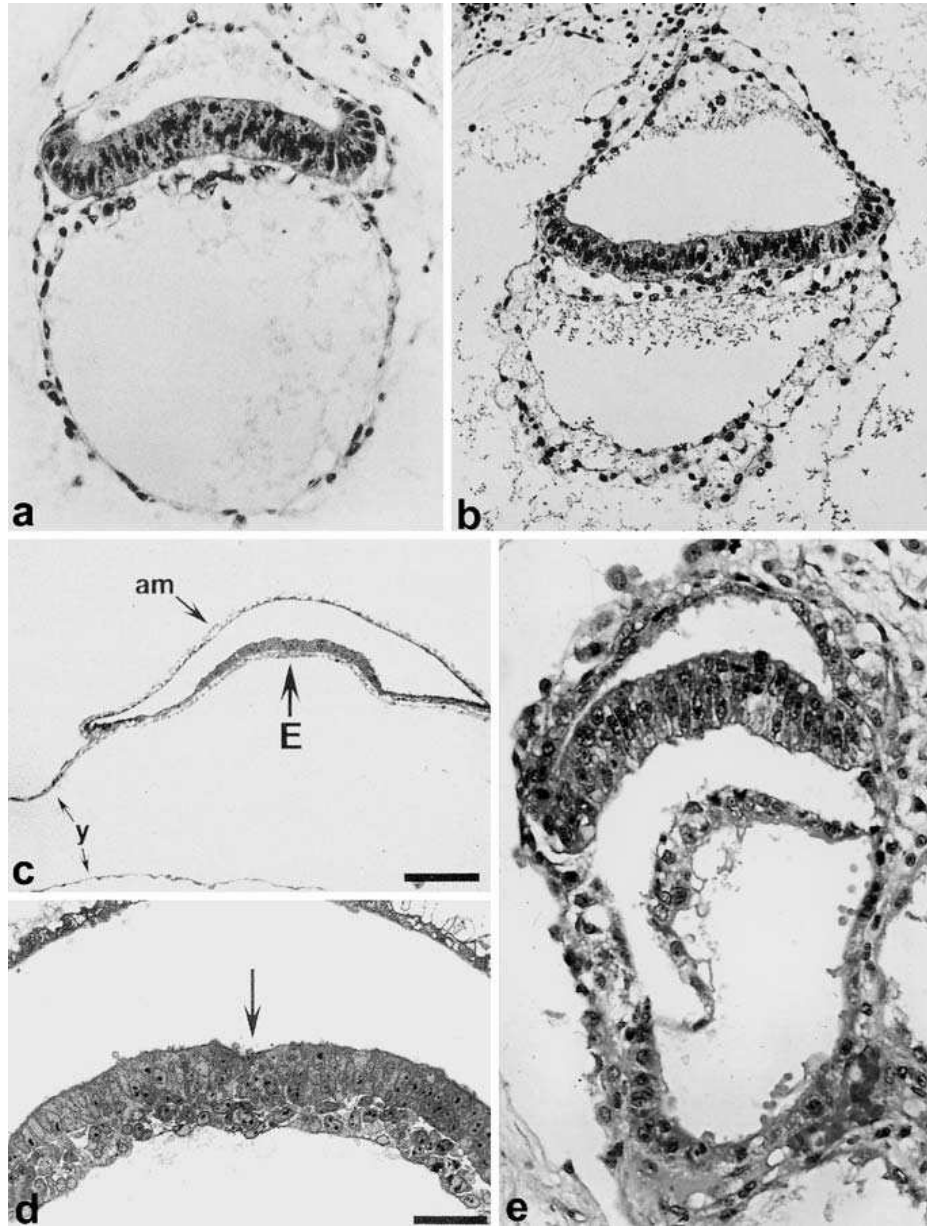
"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt

Selbstorganisation in „Gastruloids“

„Gastruloids“

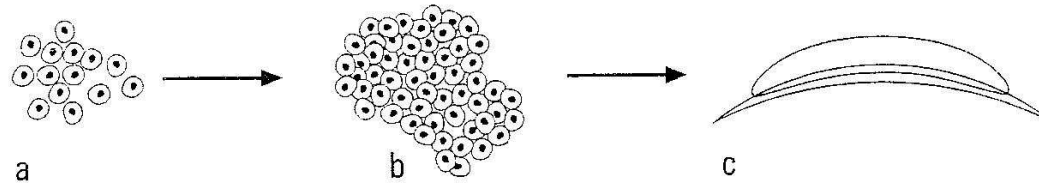
(van den Brink et al.: Development **141**, 4231-4242, 2014)

- Aggregates of mouse ESCs, of about 300 cells, “**self-organised** into polarised structures that exhibit collective behaviours reminiscent of those that cells exhibit in early mouse embryos”.
- „... a stable axis, as reflected by localised expression of Bra, Sox17 and FoxA2, can be initiated **without external influences**“.
- „In our experiments the signals are ubiquitous and so **the symmetry-breaking event must be intrinsic to the aggregates, raising the possibility that a similar spontaneous event takes place in the embryo**“.



- a, b: Menschliche Embryonen (Carnegie Stages 6a; 7b mit Primitivstreifen).
- c, d: ES-Zellen, Weißbüscheläffchen. Selbstorganisation in vitro (Thomson, J.A. et al.: Biol. Reprod. 55: 254-259, 1996).
- E: Embryoide Struktur in einem menschlichen Teratokarzinom.

(Denker, H.-W.: Naturwissenschaften 91, 1-21, 2004)



Experiment von Thomson et al. (1996)

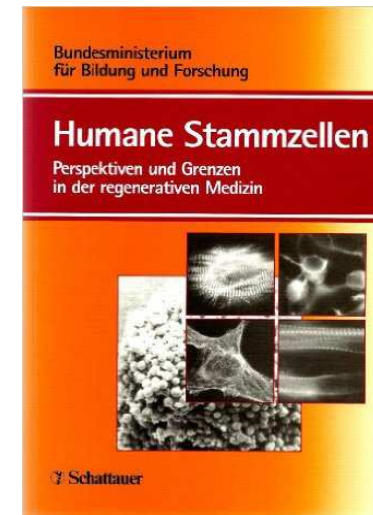
a Cluster von ES-Zellen

b „embryoid body“

Abb. 4.3 **c** „embryoid body“ nach 4-wöchiger Kultur *in vitro* (Querschnitt)

H.M. Beier: Zur Problematik von Totipotenz und Pluripotenz. In: Humane Stammzellen. Perspektiven und Grenzen in der regenerativen Medizin (Bundesministerium für Bildung und Forschung, Hrsg.). Stuttgart/New York, Schattauer, 2001, pp. 55-70.

**(Polemische Verfälschung:
Primitivstreifenbildung aus der Darstellung
fortgelassen)**



5. November 2016

"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt

Autonomie - Heteronomie

*Entwicklung von präimplantativen menschlichen
Embryonen:*

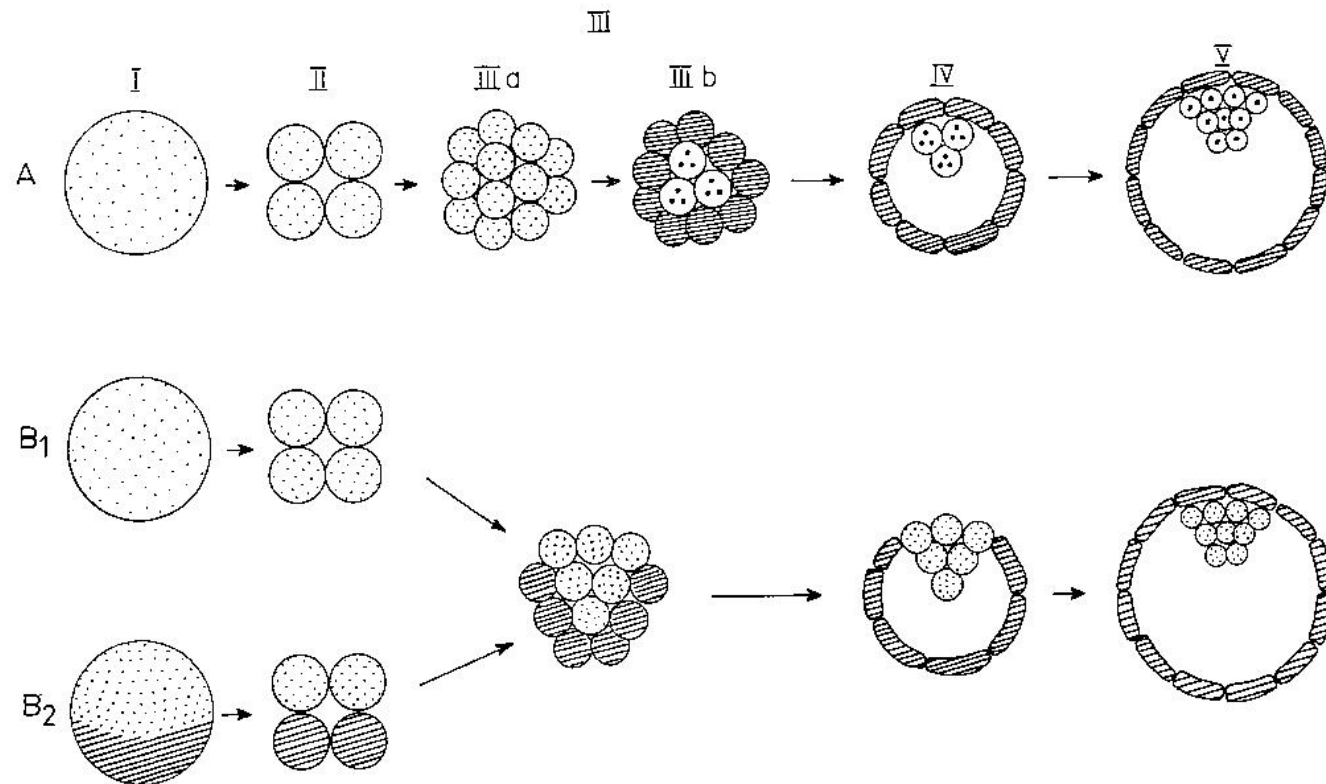
Intrinsische Faktoren (Selbstorganisation)

Extrinsische Faktoren (abhängige Entwicklung)

z.B. Rolle der Implantation im Uterus

Was ist ein früher Embryo (Morula, Blastozyste)?

Erste Achseninformation in der Embryogenese und Determination von Trophoblast und Embryoblast



Denker, H.-W.: Formation of the blastocyst: Determination of trophoblast and embryonic knot. Current Topics in Pathol. 62, 59-79 (1976)

5. November 2016

"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt

Resumé

Die Selbstorganisationsfähigkeiten im Hinblick auf Musterbildung für die Körpergrundgestalt sind bei

- frühen Embryonen und
- Kolonien pluripotenter Stammzellen

nicht so unterschiedlich, wie bislang meist angenommen wurde.

Die organismische Ganzheit eines frühen Säugetierembryos ist von besonderer Art (einfache Asymmetrien, Regulationsfähigkeit). Kolonien pluripotenter Stammzellen besitzen ähnliche Musterbildungsfähigkeiten. Daher erscheint ein „Engineering“ bis zur Bildung einer Körpergrundgestalt aus Stammzellen (ohne Hilfsembryonen) und dem Erwerb einer funktionellen organismischen Ganzheit als durchaus möglich.

Folgerungen für die Schutzwürdigkeit

Als schutzwürdig sollte demnach eine Entität (Zygote, frühe Blastomere, aber auch eine mit der Selbstorganisation beginnende Gruppe von „pluripotenten“/omnipotenten Stammzellen) immer dann angesehen werden, wenn sie systembiologisch gesehen eine funktionelle Ganzheit besitzt, die bei Vorliegen geeigneter Rahmenbedingungen die autonome Entwicklung einer Körpergrundgestalt ermöglicht.

[Beachte: Die Ganzheit vom frühembryonalen Typus hat noch andere systembiologische Eigenschaften als die Ganzheit des Adulten (Regulationsfähigkeit)].

Zusammenfassung (I): **Embryonen: Potentialität, Autonomie**

- Die Ergebnisse aktueller biologischer Forschung (u.a. Epigenetik) bringen das **Potentialitätsargument** durchaus nicht in Bedrängnis. Dieses Argument muss nur modern, d.h. **systembiologisch**, verstanden werden.
- **Organismische Ganzheit:** Die Zygote (Morula, Blastozyste) besitzt strukturelle Vorgaben für Musterbildung (zur Entwicklung einer Körpergrundgestalt), die aber (systembiologisch gesehen) noch sehr **einfach** sind. Zu den Besonderheiten frühembryonaler Systeme gehört die Flexibilität (Regulationen).
- **Autonomie:** Die Kaskaden der Morphogenesevorgänge laufen in den Embryonen autonom ab und benötigen keine externen Instruktionen (etwa von seiten des Uterus), aber eine schützende (morphogenetisch neutrale) Umgebung, da sie von außen beeinflussbar (störbar) sind.

Zusammenfassung (II): **Stammzellen: Selbstorganisation**

- Gruppen von „**pluripotenten**“ **Stammzellen** sind zur autonomen frühembryonalen Musterbildung (Selbstorganisation) in sehr viel ausgeprägterem Maß fähig als früher angenommen.
- Dies schließt Prozesse ein, die in der normalen Embryogenese zur Bildung der **Körpergrundgestalt** (**Primitivstreifen** usw.) führen.
- Eine Steuerung dieser Prozesse („**Engineering**“) in Stammzellkolonien im Sinn einer Angleichung an die normale Embryonalentwicklung erscheint möglich und wird von einigen Untersuchern angestrebt.

Zusammenfassung (III)

Ethik (1)

Solche Versuche zur „Optimierung“ der frühembryonalen Musterbildungsprozesse in Kolonien menschlicher „pluripotenter“ Stammzellen ist ethisch hoch problematisch, da dies die Prozesse sind, bei denen die Bildung der Körpergrundgestalt (Basic Body Plan; Individuation!) einsetzt.

Die besprochenen Versuche zeigen ein **höheres** Maß an **Autonomie** bezüglich der Entwicklung einer **organismischen Ganzheit** als zuvor angenommen:

- **Blastozysten:** aktuelle Autonomie;
- **Stammzellen:** Fähigkeit zur Entwicklung einer solchen Autonomie in Stammzellkolonien (abhängig von den Kulturbedingungen).

Zusammenfassung (IV)

Ethik (2)

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.



Review

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

Hans-Werner Denker

Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen, Universitätsklinikum, Hufelandstr. 55, 45122 Essen, Germany; hans-werner.denker@uni-due.de; Tel.: +49-201-403-792; Fax: +49-201-437-7593

Academic Editor: Alexander E. Kalyuzhny

Received: 22 July 2016; Accepted: 12 October 2016; Published: 25 October 2016

Cells **5**(4), E39 (doi:10.3390/cells5040039) (2016)

5. November 2016

"Der manipulierbare Embryo"
Eichstätt-Ingolstadt