

UNIVERSITÄT LEIPZIG
Fakultät für Mathematik und Informatik
Institut für Informatik

**Analyse von zell- und systemspezifischen Einflussfaktoren auf die
Variabilität des Repopulationsverhaltens hämatopoetischer
Stammzellen mit Hilfe von Computersimulationen**

Diplomarbeit

Leipzig, Februar, 2003

vorgelegt von

Hänel, Jana

geb. am: 22. Juli 1978

Studiengang: Informatik

Kurzzusammenfassung

Das Wissen über die zellulären und molekularen Mechanismen, die Stammzellen befähigen das hämatopoetische System aufrecht zu erhalten, ist weitgehend unvollständig. Es existieren verschiedene Theorien darüber, in wie weit zell- oder systemspezifische Einflüsse die Selbsterneuerung und die Differenzierungsprozesse der hämatopoetischen Stammzellen steuern.

Eine experimentelle Möglichkeit zur Überprüfung der Hypothesen sind Repopulationsexperimente mit verschiedenen Zellpopulationen. Die Zellkulturen bestanden aus Nachkommen einer einzigen Stammzelle oder aus verschiedenen Stammzellen. Es liegen Resultate vor, die zeigen, dass Transplantationen mit kleinen Zellzahlen eine starke Heterogenität erzeugen. Repopulationen mit großen Transplantaten zeigen eine kleine Variabilität in den Zellanteilen. Es konnten langfristige Trends in den Zellkinetiken festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch biologische Annahmen über die Zelleigenschaften und die Umsetzung des experimentellen Ablaufes verschiedene Modellszenarien entwickelt und simuliert. Modellannahmen und Parameterwahl basieren hierbei auf den experimentellen Beobachtungen.

Es wird untersucht, welche zell- bzw. systemspezifischen Einflußfaktoren notwendig sind, um die gewünschte Variabilität im Repopulationsverhalten zu erzeugen. Eine große Heterogenität ist bei Transplantation mit kleinen Zellzahlen zu erreichen, wobei kleine Variabilitäten im Repopulationsverhalten mit großen Transplantatgrößen erzielt werden können. Langfristige Trends in den Zellverläufen bei Konkurrenz zweier Zelltypen sind nur mit Änderungen in den Zelleigenschaften zu erzeugen.

Die Ergebnisse der Simulationen und der Mausexperimente werden miteinander verglichen und diskutiert. Weiterhin werden Vorschläge für Erweiterungen des benutzten Modells und Experimente aufgezeigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Motivation	3
1.2	Zielstellung	5
2	Biologische Grundlagen	7
2.1	Hämatopoetische Stammzellen und ihre Eigenschaften	7
2.2	Experimentelle Daten	8
2.2.1	Eigenschaften der verwendeten Zelltypen	8
2.2.2	Ablauf der Experimente	10
2.2.3	Experimentelle Ergebnisse	11
2.2.4	Auswertung	11
3	Modell und Simulationen	14
3.1	Modell der primitiven Hämatopoese	14
3.2	Simulationsexperimente am Computer	18
3.2.1	Modellparameter	18
3.2.2	Allgemeine Durchführung	19
3.2.3	Durchführung des ersten Telexperimentes	21
3.2.4	Durchführung des zweiten Telexperimentes	22
3.3	Modellannahmen	24
4	Resultate	27
4.1	Parameter und deren Einfluss	27
4.1.1	Bindungsaffinität a	27
4.1.2	Initialzellzahlen	28
4.1.3	Übergangskurven f_α und f_ω	28
4.1.4	Faktoren r und d	30
4.2	Telexperiment 1	33
4.2.1	Unterschiedliche initiale Attachment-Affinities und Startzellzahlen	33
4.2.2	Unterschiedliche attachment-affinities im LTC-IC	36
4.3	Telexperiment 2	39
4.3.1	Verläufe bei Zellen ohne zellintrinsische Unterschiede	39
4.3.2	Verläufe bei Zellen mit zellintrinsischen Unterschieden	40

4.3.3	Verläufe bei Überleben von Zellen des sekundären Empfänger nach Bestrahlung mit 10.6 Gy und Transplantation von Zellen aus primären Wirt ohne Anwachsen der $W^{41}W^{41}$ -Zellen	44
5	Diskussion	46
5.1	Auswertung der Simulationsresultate	46
5.1.1	Erstes Teilexperiment	46
5.1.2	Zweites Teilexperiment	47
5.2	Ausblick	48
5.2.1	Modell und Simulationen	48
5.2.2	Experimente	49
A	Anhang	50
A.1	Skripte	50
A.1.1	Simulationsdurchführungen	50
A.1.2	Zufällige Aufteilung der Transplantate und Aktivierung von schlafenden Zellen	53
A.1.3	Aufbereitung der Daten für SPSS	54
A.2	Weitere Ergebnisse	57
A.2.1	Teil 1	57
A.2.2	Teil 2	59
	Literaturverzeichnis	64
	Abbildungsverzeichnis	66
	Tabellenverzeichnis	68
	Erklärung	69

1 Einleitung

1.1 Motivation

Das Blut ist eine Körperflüssigkeit aus festen (zellulären) und gelösten Bestandteilen mit lebensnotwendigen Funktionen. Es versorgt die Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, außerdem transportiert es Kohlendioxid und Abfallprodukte zu den Ausscheidungsorganen. Des weiteren übernimmt das Blut wichtige Aufgaben in der Immunabwehr, der Regulation des Wärmehaushaltes des Organismus sowie in der Blutgerinnung beim Verschluss von Wunden. Der Prozess der Entwicklung von Blutzellen wird Hämatopoese genannt und findet hauptsächlich im Knochenmark statt. Dabei produziert ein kleiner Pool undeterminierter multipotenter Stammzellen durch Differenzierung und Reifung einen ständigen Nachschub an funktionalen Blutzellen. Dieser wird benötigt, um die abgestorbenen Zellen zu ersetzen und einen geringen Blutverlust kompensieren zu können.

Ihre speziellen Eigenschaften haben die Stammzellen in den Blickpunkt der Wissenschaft gerückt. Stammzellen werden heutzutage als mögliches Quellmaterial angesehen, um geschädigtes Gewebe zu ersetzen oder Organe für Transplantationen züchten zu können. Die Zucht von einigen adulten Stammzellarten ist bis heute noch schwer zu realisieren. Andere Stammzellen, dazu gehören die embryonalen Stammzellen, sind verhältnismäßig leicht zu züchten. Der Gebrauch von Stammzellen aus Embryonen (diese Zellen sind in der Lage alle Zelltypen des Körpers zu bilden) wirft eine Vielzahl von ethischen Fragen auf. Adulte Stammzellen werden in der heutigen Zeit bereits in der Therapie bei Knochenmarkserkrankungen und Hautschäden verwendet.

Trotz großer Fortschritte in der Forschung sind die Differenzierungs- und Regulierungsmechanismen der hämatopoetischen Stammzellen heutzutage noch ungeklärt. Durch ein besseres Verständnis der Stammzellorganisation, vor allem das Zusammenspiel zwischen Zelle und Wachstums Umgebung, ist es möglich bessere Therapien für bestimmte Krankheiten (z.B. Leukämie) zu entwickeln. Ein Problem bei der Forschung ist, dass Stammzellen morphologisch schwer zu identifizieren sind. Sie sind nur anhand ihres Verhaltens als solche bestimmbar. Zur quantitativen Bestimmung von hämatopoetischen Stammzellen werden *in vitro*- (Ploemacher [11]) und *in vivo*-Verfahren (Till [15]) verwendet.

Um das Repopulationsverhalten von Stammzellen zu untersuchen, wurden *in vivo*-Experiment durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde einer C57BL/6-Maus (kurz: B6-Maus) Kno-

chenmarkszellen entnommen und auf die Stromalinie¹ des Typs S17 gepflanzt. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen [11, 13] und statistischen Berechnungen wurde gewährleistet, dass eine Zellkolonie, die sich im S17 entwickelt hat, nur aus einer Stammzelle hervorgegangen ist. Diese Zellkolonien werden in bestrahlte Mäuse (primäre Wirtstiere) injiziert. Acht Monate wurde der Anteil der entstandenen Nachkommen der B6-Spenderzelle im peripheren Blut des Empfängertiers beobachtet. Die zeitlichen Verläufe der Anteile zeigten eine starke klonale² Heterogenität. Nach den acht Monaten wurde den primären Wirtstieren Knochenmarkszellen entnommen. Dabei wurden die Zellen eines Wirtstieres in 2-4 Transplantate aufgeteilt. Vor der zweiten Transplantation wurden die Empfängermäuse mit einer hohen Dosis bestrahlt und erhielten dann je 5×10^6 Zellen. Dabei bekamen immer 2-4 sekundären Wirtstieren Knochenmarkszellen aus dem gleichen primären Wirt injiziert. Wiederum wurde acht Monate lang den Anteil der entstandenen Nachkommen der B6-Spenderzellen im peripheren Blut des sekundären Empfängertieres beobachtet. Die Verläufe der Anteile der Blutzellen bei den Tieren, die Zellen aus unterschiedlichen primären Wirten erhalten haben, sind stark heterogen. Beim Vergleich der Kinetiken von Tieren, denen Zellen aus dem gleichen primären Wirt transplantiert wurden, sind ähnliche Verläufe mit geringer Variabilität und langfristige Trends zu erkennen. Aufgrund dieses Experimentes wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Stammzellenverhalten durch vererbte intrinsische Eigenschaften vorprogrammiert ist. Die Heterogenität bei den primären Wirten kommt nur durch die Mischung der Klone aus unterschiedlichen B6-Spenderzellen zustande. Nun muss das Problem geklärt werden, welche Eigenschaften der Stammzellen und deren Wachstums Umgebung für dieses Verhalten verantwortlich sind. Außerdem stellt sich die Frage, ob dieser Annahme zugestimmt werden kann, oder ob es eine weitere Erklärung für die experimentellen Ergebnisse gibt.

In *in vivo*-Experimenten können oft nur einzelne Einflussgrößen und nicht die Gesamtheit ihrer dynamischen Wirkungsweise untersucht werden. Es sind oftmals mehrere Interpretationen der Ergebnisse möglich, weil sie durch eine Vielzahl von Kombinationen potentieller Faktoren hervorgerufen werden können. Dynamische Regulationsmechanismen sind schwer experimentell zu prüfen. Für eine genauere Beschreibung der Vorgänge innerhalb des Prozesses der Hämatopoese ist ein dynamisches quantitatives Stammzellmodell nötig. Mit Hilfe eines solchen Modells ist es möglich, dynamische Analysen durchzuführen, verschiedene Kombinationen von Faktoren auf ihre Konsistenz zu überprüfen und Hypothesen zu ge-

¹Das Stroma des Knochenmarks bestehen aus Bindegewebszellen, welche die Fähigkeit haben, sich zu Knorpel-, Knochen- und Fettzellen zu differenzieren. Stromazellen spielen eine bedeutende Rolle bei den Differenzierungsprozessen von HS-Zellen zu reifen Blutzellen. Stromalinen dienen bei *in vitro*-Experimenten als Wachstums Umgebung. Sie werden aus Knochenmarkszellen gezüchtet.

²als Klon werden alle Nachkommen einer Ursprungstammzellen bezeichnet

nerieren. Dadurch können das Repopulationsverhalten und die allgemeinen Kompletions- und Fluktuationsphänomene interpretiert werden. Der Vorschlag eines Erklärungsansatzes ist das bereits existierende Modellkonzept der innergeweblichen Plastizität [12]. Die einzelnen Stammzellen können innerhalb eines Bereiches möglicher Optionen ihre Eigenschaften, abhängig von der lokalen Wachstums Umgebung, reversibel ändern. Die stochastischen Übergänge zwischen den Wachstums Umgebungen führen zu Schwankungen, die schließlich die Heterogenität generieren. Dieses Modellkonzept führt eine völlig neue Sichtweise auf die Stammzellorganisation ein, wobei das Stammzellpotential nicht als eine zelluläre Eigenschaft, sondern als Ergebnis eines dynamischen Selbstorganisationsprozesses behandelt wird.

Die Anwendung des Modells auf die experimentellen Daten soll zu möglichen Erklärungsansätzen der Ergebnisse prüfen.

1.2 Zielstellung

Bei den im letzten Abschnitt vorgestellten *in vivo*-Experimenten konnten hauptsächlich zwei Phänomene beobachtet werden:

- a) große Variabilität des Repopulationsverhaltens basierend auf unterschiedlichen Einzelstammzellen
- b) Ähnlichkeit des Repopulationsverhaltens bei Zellen mit identischen klonalen Ursprung.

Aufgrund dieser beobachteten Phänomene wurde durch die beteiligten Biologen die Hypothese aufgestellt, dass das Zellverhalten vorprogrammiert ist und von der Ursprungstammzelle auf ihre Nachkommen weitervererbt wird. Dieser Behauptung steht die alternative Hypothese gegenüber, dass sich die Phänomene auch ohne zellintrinsische Einflüsse erklären lassen. Um eine modellbasierte Diskriminierung dieser beiden Ansätze erreichen zu können, war es nötig, den Ablauf der *in vivo*-Experimente in das existierende Modell der Stammzellorganisation [12] zu übertragen. Dabei wurde darauf geachtet, dass so wenige Parameter wie möglich geändert wurden.

Zuerst soll in dieser Arbeit überprüft werden, ob das Computermodell in seiner jetzigen Form den generellen Ablauf reproduzieren kann. Die Simulationsergebnisse sollten den biologischen Resultaten entsprechen. Dabei ist darauf zu achten, dass im ersten Telexperiment eine große Heterogenität in der zeitlichen Entwicklung der Zellklone erreicht wird. Im zweiten Abschnitt des Experimentes wurde eine geringe Variabilität bei der Repopulationskinetik innerhalb der Nachkommen eines Klones beobachtet. Wobei die Nachkommen

verschiedener Klone dabei signifikant unterschiedliche Anstiege in ihrem Repopulationsverhalten aufzeigen.

Weiterhin wurden die angepassten Parameterwerte auf ihre biologische Plausibilität überprüft und diskutiert, ob die Parameter, die für die Nachbildung des Repopulationsverhaltens am besten geeignet waren, nur extrinsische oder aber auch intrinsische Zellmechanismen beschreiben. Dies ist nötig, um die Hypothese der Biologen eventuell entkräften oder untermauern zu können.

2 Biologische Grundlagen

2.1 Hämatopoetische Stammzellen und ihre Eigenschaften

Ein Individuum besteht aus einer Vielzahl spezialisierter Gewebszellen und einer kleinen Anzahl multipotenter gewebspezifischer Stammzellen. Diese Stammzellen werden auch als adulte Stammzellen bezeichnet und sollten nicht mit den in Embryonen vorkommenden embryonalen Stammzellen verwechselt werden. Pluripotente embryonale Stammzellen sind in der Lage, alle Zelltypen des Körpers zu bilden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden *in vivo*-Experimente befassen sich mit den hämatopoetischen Stammzellen. Sie unterscheiden sich von reifen Zellen durch besondere Eigenschaften [8, 9]. Die Wachstumsumgebung der Stammzellen ist das Knochenmark. Sie sind undifferenzierte Zellen, welche meist einen heterogenen Pool bilden. Stammzellen besitzen die Fähigkeit, durch Zellteilung neue Stammzellen zu produzieren (Autoreproduktion) oder sich durch Differenzierung in die verschiedenen linienspezifischen Blutzellen bzw. deren Vorläuferzellen zu entwickeln (Abbildung 1). Dabei müssen sie in der Lage sein, nicht nur den täglichen Bedarf an neu zu bildenden Blutzellen abzudecken (Homeostase), sondern auch bei erhöhtem Bedarf, z.B. nach einer Verletzung oder bei einer Erkrankung, die Blutbildung aufrecht zu erhalten.

Bei Experimenten [2] wurde beobachtet, dass Stammzellen nicht nur darauf beschränkt sind, Zellen eines Gewebetyps zu produzieren. Bei einer Transplantation in die Wachstumsumgebung eines anderen Gewebetyps wirkten deren extrinsische Einflüsse auf eine Stammzelle. Dadurch war sie in der Lage, sich anzupassen und erlangte die Fähigkeit, Zellen dieser Gewebeart bilden zu können.

Bei *in vivo*-Experimenten, bei denen hochdosisbestrahlte Tieren eine entsprechende kleine Menge an Stammzellen injiziert wird, beobachtet man ein großes Spektrum an Ergebnismöglichkeiten. Es wird angenommen, dass die Hämatopoese durch einen stochastischen Prozess beschrieben werden kann [1, 15]. Die Behauptung, dass alle Stammzellentscheidungen (Zelltod, Zellteilung oder Differenzierung) zufällig getroffen werden, wurde aufgestellt. Bei Simulationen war es möglich durch die stochastischen Unterschiede ein ebenso breites Spektrum an Ergebnissen zu erhalten, wie bei vorrausgegangenen *in vivo*-Experimenten.

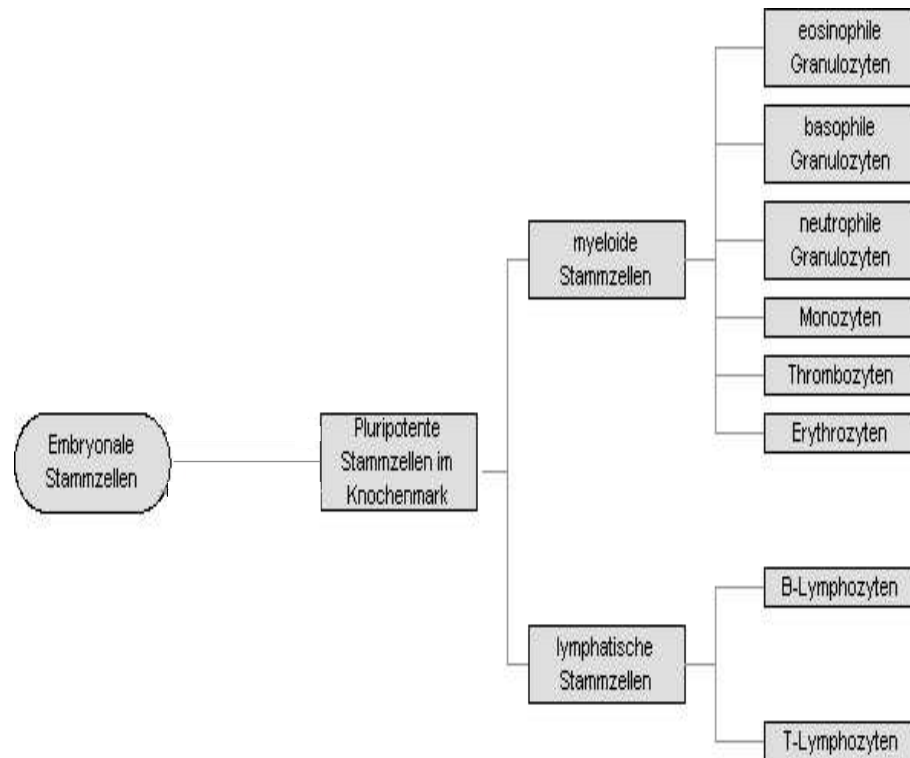


Abbildung 1: Hämatopoetische Zelltypen

2.2 Experimentelle Daten

2.2.1 Eigenschaften der verwendeten Zelltypen

In den *in vivo*-Experimenten, deren Ergebnisse in dieser Arbeit reproduziert und erklärt werden sollen, werden drei unterschiedliche Mäusestämme verwendet.

Während des gesamten Experimentes wurde das Repopulationsverhalten des Zelltyps der Spendermaus untersucht. Diese Zellen stammen aus C57BL/6-Mäusen mit dem Antigen Ly5.1⁺, welches als Marker zum Nachweisen dieses Zelltyps dient (Kurzbezeichnung: B6-Ly5.1).

Die B6-Ly5.1-Zellen wurden auf die Stromalinie des Typs S17 [16, 17] gepflanzt. Die Stromazelllinie S17 wird aus Mauseknochenmarkszellen gezüchtet und enthält einen hohen Grad an repopulierenden Stammzellen. Im Allgemeinen hat das Kultivieren von Stammzellen auf Stromalinen zur Folge, dass die Repopulationskapazität der Zellen abnimmt. Stroma des Typs S17 hat die Eigenschaft, dass die Qualität der Stammzellen im Vergleich zu frischen Knochenmark annähernd gleich bleibt. Eine hohe Repopulationskapazität ist ein Zeichen

für das Vorhandensein von primitiven multipotenten Stammzellen. Die B6-Zellen im S17 entwickeln sich quantitativ und qualitativ nahezu wie frisch entnommenes Knochenmark [16, 17].

Bevor die B6-Ly5.1-Zellen auf die S17-Stromalinie gegeben worden sind, wurden Verdünnungsreihen [11, 13] durchgeführt. Die Bedingungen für dieses Verfahren wurden so gewählt, dass weniger als 20% der Knochenmarkstransplantate nach vier Wochen im S17-Stroma eine Zellkolonie aufwiesen. Statistische Berechnungen führten zu der Annahme, dass 90% der entstandenen Zellkulturen aus einer einzigen Stammzelle hervorgegangen sind. Zellen, die Nachkommen einer ursprünglichen Stammzelle sind, werden Klon genannt. Eine Kultur, die aus mindestens einer Stammzelle hervorgegangen ist und nach einer bestimmten Zeit t Koloniewachstum aufweist, wird als positiv bezeichnet.

Die entstandenen Zellkulturen aus der S17-Zelllinie werden in $W^{41}W^{41}$ -Mäuse injiziert. Diese Wirtstiere besitzen das Antigen Ly5.2 als Marker. Außerdem leiden sie an einem c-kit-Defekt, der zu einer Anämie führt. Werden solchen Mäusen B6-Stammzellen transplantiert, sind nach einer gewissen Zeit alle Zellen des anämischen Tieres durch Nachkommen der B6-Zellen ersetzt worden [7, 5]. Eine Erklärungshypothese, für diese Beobachtung ist, dass der Defekt an Kit-Rezeptoren zur Verminderung der primitiven hämatopoetischen Stammzellen führt und die Anzahl der verfügbaren „Nischen“ im Knochenmark ansteigt (Nischenmodell bei Transplantationen [14]). Diese freien Stellen können von B6-Zellen besetzt werden, welche die Produktion von differenzierten Zellen steigern und dadurch Anämie verbessern können. Eine Alternative zu der Nischenhypothese [5] besagt, dass die Spender- und Wirtsstammzellen um die begrenzte Anzahl an freien Stromabindungsstellen (Erklärung Abschnitt 3) konkurrieren. Die Fähigkeit des Kit-Rezeptors sich an diese freien Stellen anzuhafte, verschafft den Zellen mit normaler Rezeptorfunktion einen Vorteil gegenüber den Zellen mit c-kit-Defekt. Die $W^{41}W^{41}$ -Zellen können durch Kompetitionsprozessen mit den B6-Zellen verdrängt werden.

Die sekundären Wirtstiere sind hochdosisbestrahlte C57BL/6-Mäuse, welche Knochenmarkzellen aus dem primären Wirten erhalten. Diese Mäuse besitzen weder ein Allel für das Ly5.1- noch für das Ly5.2-Antigen (Bezeichnung: $CD45^{-/-}$). Mit Hilfe von Immunofluoreszenz können die verschiedenen Ly5-Antigene der Zelltypen markiert und somit unterschieden werden.

2.2.2 Ablauf der Experimente

Es existieren unterschiedliche Hypothesen darüber, welche Einflüsse die Entwicklung einer blutbildenden Stammzelle regulieren. Eine behauptet, dass die Beeinflussung durch die Wachstums Umgebung hervorgerufen wird, die andere vertritt die Annahme, dass intrinsische sowie extrinsische Einflüsse eine Stammzelle steuern. Wiederum andere nehmen an, solche Zellen werden nur durch intrinsische Eigenschaften reguliert.

Mit Hilfe von *in vivo*-Experimenten soll geklärt werden, welche der Hypothesen zutreffend ist (Müller-Sieburg [3, 10]).

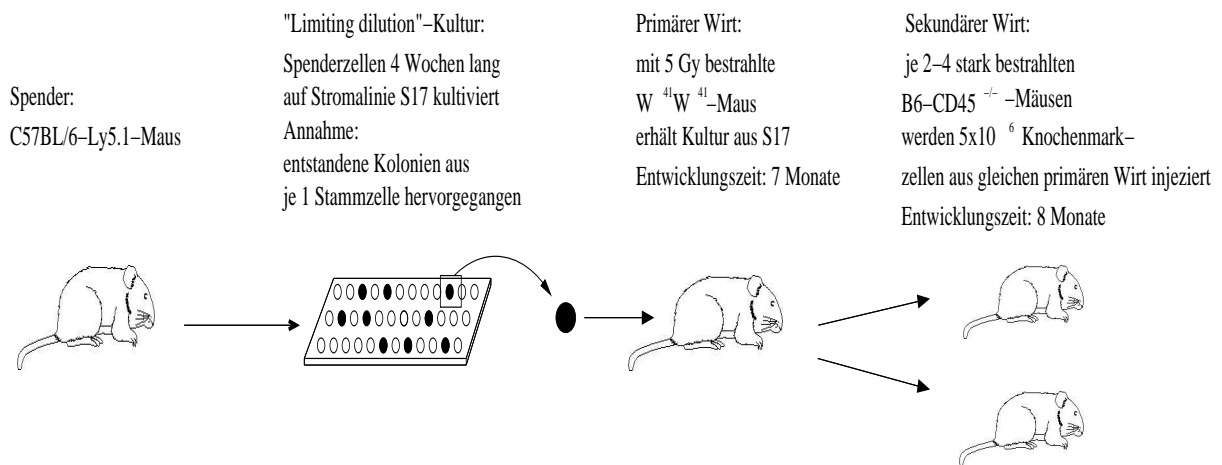


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Experimentablaufs

Die Untersuchung besteht hauptsächlich aus zwei Teilen.

1. Telexperiment:

Einer Maus wurden Knochenmarkszellen (B6-Zellen mit einem Ly5.1-Marker) entnommen und auf der Stromalinientyp S17 kultiviert. Mit Hilfe einer vorher durchgeführter Verdünnungsreihe („Limiting-dilution“ [11, 13]) und stochastischen Simulationen wurde gewährleistet, dass eine Zellkultur sich aus einer einzigen Stammzelle entwickelt hat. Diese Kulturen, die Koloniewachstum aufwiesen, wurden als positives Well bezeichnet. Nach vier Wochen sind diese positiven Wells in bestrahlte ($1 \times 500\text{cGy}$) anämische Mäuse [7, 5] verpflanzt worden. Eine solche $W^{41}W^{41}$ -Maus enthält Zellen mit einem Ly5.2-Marker. Durch die unterschiedliche Markierung (unterschiedliche Ly5-Antigene) sind die zwei Zelltypen voneinander unterscheidbar. In regelmäßigen Intervallen wurde den Empfängertieren Blut entnommen und der Anteil der B6-Ly5.1-Zellen gemessen.

2. Telexperiment:

Nach 7 Monaten wurden Knochenmarkzellen aus dem $W^{41}W^{41}$ -Wirtstieren entnommen und in hochdosisbestrahlte (10.6 Gy) B6-Mäuse ohne Ly5.1- bzw. Ly5.2-Antigen (Bezeichnung: $CD45^{-/-}$) injiziert. Den Knochenmarkzellpool eines Spenders wurde auf 2-4 Empfängertiere aufgeteilt. Jede Maus erhielt dabei 5×10^6 Zellen. Wiederum wurde in regelmäßigen Abschnitten der Anteil der B6-Ly5.1-Zellen gemessen.

2.2.3 Experimentelle Ergebnisse

Insgesamt besteht die erste Testreihe aus 23 Mäusen (Abbildung 3 zeigt eine repräsentative Auswahl). Zwei dieser Tiere mit der Bezeichnung *bm1* und *bm2* haben je 1×10^5 frische Knochenmarkzellen anstatt der positiven Wells erhalten. Sie dienen zur Kontrolle. Die Messungen fanden im 1., 3., 5. und 7. Monat nach der Transplantation statt (Ausnahme: 7 of 9 zusätzlich im 4. Monat).

Von 11 dieser Mäuse wurden die Zellen in je 2-5 weitere Wirtstiere verpflanzt. Die Messungen für den 2. Teil fanden zwischen den 8. und 16. Monat statt (Zeitpunkt 0: Transplantation beim primären Wirt).

Bei jeder Messung ist der Anteil in Prozent dreimal bestimmt worden und daraus wurde der Mittelwert berechnet. Die Ergebnisdaten wurden zur Verfügung gestellt.

2.2.4 Auswertung

Die Diagramme stellen den zeitlichen Verlauf der Anteile der B6-Spenderzellen im Blut dar.

In Abbildung 3 ist eine große Variabilität bezüglich des prozentualen Anteils der Spenderzellen im Blut zu erkennen. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen wurde sicher gestellt, dass sich die Zellkultur des Transplantates aus nur einer Stammzelle entwickelt hat. Einen Monat nach der Transplantation ist schon ein breites Spektrum (0-70%) an Spenderzellanteilen möglich, welches sich im weiteren Verlauf noch vergrößert. Bei einige Versuchstieren (*r32.480*, *r42.3256*) verringert sich der Anteil der B6-Zellen wieder, bei anderen (*r16.4*, *B2*, *B4*, *A3*) steigt er stetig an. Es gibt aber auch Mäuse (*r27.B3*, *C2*, *r26.T8*) bei denen die Werte, nachdem sie erst angestiegen sind, später wieder fallen. Daraus lässt sich erkennen, dass hämatopoetische Stammzellen in ihren Repopulationsverhalten eine starke Heterogenität aufweisen. Eine Voraussage über die Kinetik eines einzelnen Klones ist also nicht möglich.

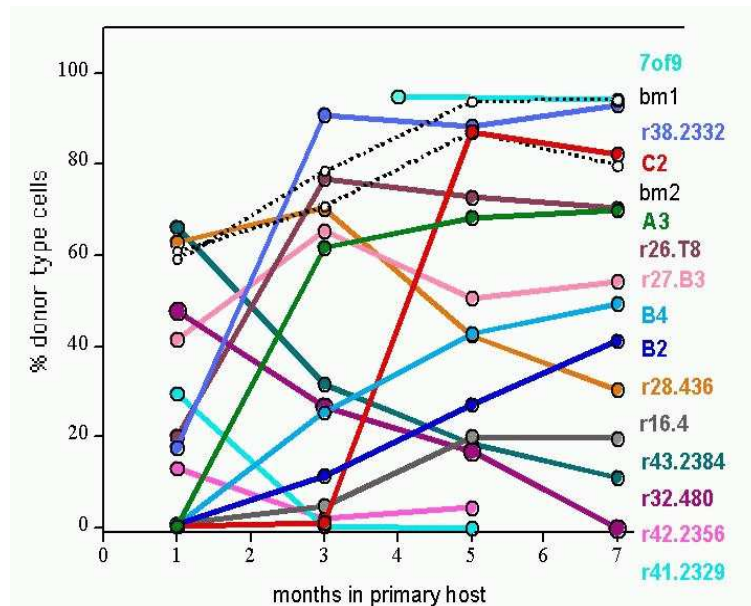


Abbildung 3: Zeitliche Verläufe der Repopulation in $W^{41}W^{41}$ -Mäusen [10]

Die Ergebnisse des zweiten Telexperimentes sind in Abbildung 4 dargestellt. Zur besseren Unterscheidung erhielten die Empfängertiere die Farben und Bezeichnungen der jeweiligen transplantierten Klone aus Abbildung 3. Die Kontrollmäuse *bm1* und *bm2* aus Bild 3a erhielten Zellen der primären Wirtstiere, welche frische Stammzellen (multiklonal) injiziert worden ist. Bei *bulk* war der erste Empfänger eine stark bestrahlte B6-Maus. Sie erhielt 2×10^5 Zellen. Diese Zellen wurden kultiviert, indem 10×10^5 Knochenmarkzellen für drei Wochen auf Stroma S17 pflanzte wurden.

Auch bei diesen Verläufen ist eine Heterogenität zwischen den unterschiedlichen Klonen erkennbar. Es gibt Tiere mit aufsteigenden (*r38.2*, *B2*), absteigenden (*B4*) oder fast horizontalen (*7of9*, *r27.B3*) Verläufen. Aber die Repopulationskinetik innerhalb eines Klones ist annähernd gleich. Zu einem Klon gehören alle Zellen, die aus einer ursprünglichen Stammzelle hervorgegangen sind. Kleine Abweichungen lassen sich durch die Annahme, dass die Hämatopoese ein stochastischer Prozess ist, erklären. *C2* ist der einzige Klon, wo die Kurven etwas weiter auseinander liegen. Die Verläufe der *bm1*- und *bm2*-Tiere zeigen eine größere Variabilität in den Anteilen der Spenderzellen.

Die Annahme, dass das Verhalten hämatopoetischer Stammzellen im adulten Knochenmark vorprogrammiert ist, wurde daraufhin aufgestellt. Die extrinsischen Einflüsse haben kaum eine Wirkung auf Stammzellen. Es wird angenommen, dass die Steuerung der Stammzellen durch vererbte zellintrinsische Eigenschaften, die in einem früheren Stadium der

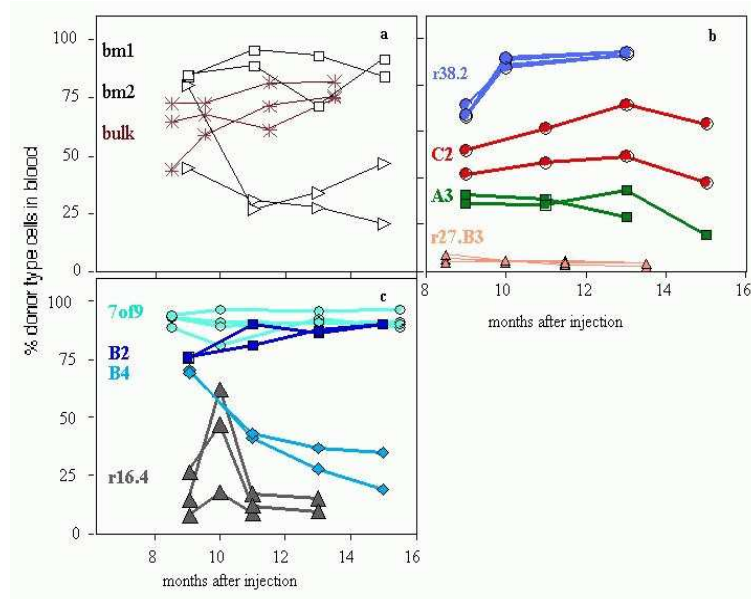


Abbildung 4: Zeitliche Verläufe der zweiten Repopulation [10]

Zellentwicklung festgelegt werden, bestimmt wird.

Diese Hypothese wird damit begründet (Müller-Sieburg [10]), dass die Zellpools, die aus klonalen Transplantaten entstanden sind, ähnliche Kinetiken aufweisen. Tiere (*bm1*, *bm2*), die multiklonale Transplantate erhalten haben, zeigen wiederum ein größeres heterogenes Verhalten. Es wird behauptet, dass eine Stammzelle in der embryonalen Entwicklung eine bestimmte Eigenschaften erhält, die ihre Kinetik steuern. Jede Zelle bekommt in diesem Stadium eine andere Charakteristik. Im adulten Knochenmark bildet eine solche Zelle nur noch Nachkommen, an die sie diese Eigenschaft vererbt. Somit besitzen Kulturen aus multiklonalen Transplantaten eine höhere Heterogenität als Pools, die aus nur einem Klone entstanden sind.

3 Modell und Simulationen

Stammzellforschung ist ein sehr aktuelles und vielversprechendes Thema. In den Untersuchungsmethoden werden ständig neue Fortschritte erzielt. Um die experimentell gewonnenen Daten erklären und verstehen zu können, benötigt man theoretische Modelle. Die Vorteile einer theoretischen Grundlage von Stammzellfunktionen sind:

- a) Vermutete Mechanismen können erklärt und mit den beobachteten Phänomenen und Aussagen in Übereinstimmung gebracht werden, in wie weit die Daten miteinander und mit verborgenen Mechanismen vereinbar sind.
- b) Experimente können entwickelt werden die auf Vorrausagen beruhen.
- c) Der Einfluss von Manipulationen auf ein System und dessen Reaktion können vorausgeahnt werden. Dadurch ist es möglich Behandlungsstrategien zu entwickeln.
- d) Die Anpassung der Theorie für verschiedene Gewebearten kann helfen die Gemeinsamkeiten von Aufbauprinzipien zwischen Geweben zu verstehen.

3.1 Modell der primitiven Hämatopoese

Für die Analyse der Daten mittels Computersimulationen wird ein bereits existierendes dynamisches Modell der Stammzellorganisation verwendet. Dies beruht auf dem Konzept der innergeweblichen Plastizität [12].

Hierbei werden zwei verschiedene Wachstumsumgebungen GE-A und GE- Ω (Abbildung 5) angenommen, in denen sich die Stammzellen aufhalten können.

Eine Zelle wird durch drei Variablen beschrieben:

- die Bindungsaffinität a ($a_{min} \leq a \leq a_{max}$), welche die Neigung einer Stammzelle, sich an das GE-A-Kompartiment anzulagern, bezeichnet
- die Position im Zellzyklus c ($0 \leq c \leq \tau_c$), wobei τ_c die durchschnittliche Zellzykluszeit ist
- dem Indikator m , der anzeigt, in welcher Umgebung sich die Zelle gerade befindet ($m \in \{A, \Omega\}$)

Alle sich im Kompartiment GE-A befindlichen Zellen nehmen nicht aktiv am Zellzyklus teil. Deshalb wird ihr Zustand auch als schlafend bezeichnet. Von diesen Zellen wird angenommen, dass sie an die Bindungsstellen des Stromas gebunden sind und sich in der G_0 -Phase

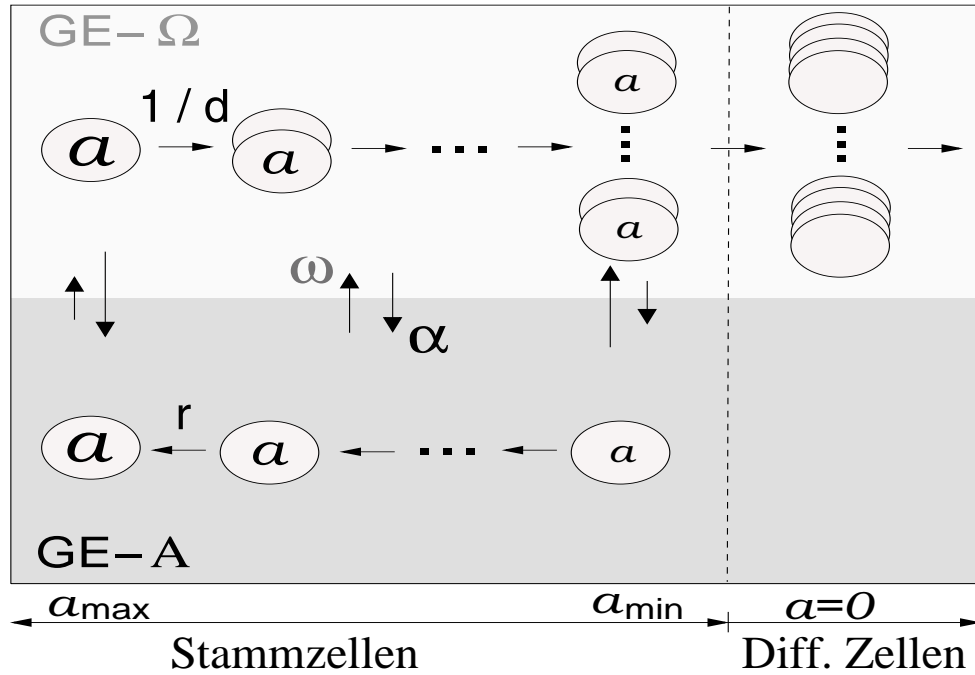


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Modellkonzeptes

³ befinden. Sie vergrößern ihre Affinität a mit dem Faktor r pro Zeitschritt, wobei sie maximal auf a_{max} ansteigen kann. Schlafende Stammzellen können aktiviert werden und gelangen in die Umgebung GE-Ω. Dies geschieht, indem sie sich von den Stromabindungen lösen. Sie vermehren sich durch symmetrisch Verdoppelung zum Zeitpunkt $c = \tau_c$ ist, d.h. wenn sie einen vollen Zellzyklus durchlaufen haben. Dabei werden die Parameter a und m an die Tochterzellen vererbt und ihr c erhält den Wert 0. Außerdem verringert sich das a einer aktiven Stammzelle mit dem Faktor $1/d$ pro Zeitschritt.

Erreicht die Bindungsneigung a_{min} , wird $a = 0$ gesetzt und die Zelle verliert die Fähigkeit nach GE-A zu wechseln. Zellen mit dieser Eigenschaft nennt man differenzierte Zellen. Sie fallen aus dem Pool der Stammzellen heraus.

Um die Entwicklung des Systems simulieren zu können, wird der Status aller Zellen zu diskreten Zeitschritten ($\Delta t = 1$ Stunde) synchron aktualisiert. Folgende Regeln beschreiben die Entwicklung innerhalb einer Wachstums Umgebung:

³Der Zellzyklus besteht aus einzelnen Phasen mit der zeitlichen Abfolge: G_1 (Wachstumsphase), S (Verdopplung der DNS), G_2 (Vorbereitung der Zellteilung) und M (Mitose). Eine Zelle kann den Zellzyklus zeitweilig verlassen. Das geschieht zumeist aus der G_1 -Phase heraus. Der Zustand außerhalb des Zellzyklus wird als G_0 bezeichnet.

m=Ω:

$$a(t + \Delta t) = \begin{cases} a(t)/d & , \text{ falls } a(t)/d > a_{min}, \text{ mit } d > 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (1)$$

$$c(t + \Delta t) = \begin{cases} c(t) + \Delta t & , \text{ falls } c(t) + \Delta t < \tau_c \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (2)$$

m=A:

$$a(t + \Delta t) = \begin{cases} a(t) * r & , \text{ falls } a(t) * r < a_{max}, \text{ mit } r > 1 \\ a_{max} & \text{sonst} \end{cases} \quad (3)$$

$$c(t + \Delta t) = \text{konstant} \quad (4)$$

Der Übergang von einer Wachstumsumgebung in die andere kann nur stattfinden, wenn sich die Stammzellen in der G_1 -Phase (Anfangsphase) des Zellzykluses befindet. Dieser Prozess ist stochastisch. Dabei wird mit Hilfe eines Zufallsgenerators entschieden, ob eine Zelle die Wachstumsumgebung wechselt oder nicht. Die zwei Intensitäten α bzw. ω beschreiben die Wahrscheinlichkeiten einer Stammzelle pro Zeitschritt Δt ins andere Kompartiment zu wechseln. Sie sind von der Bindungsaffinität abhängig. Ist sie klein, ergibt dies ein großes ω und ein kleines α und die Zelle neigt dazu, sich im Kompartiment GE-Ω aufzuhalten. Zellen mit großem a haben eher das Bestreben, in das Kompartiment GE-A zu gelangen, da die Intensität α steigt.

Die Definitionen für die Intensitäten lauten:

$$\alpha = \frac{a}{a_{max}} * f_\alpha \quad \text{und} \quad \omega = \frac{a_{min}}{a} * f_\omega \quad (5)$$

Die Funktionen f_α (Attachment) und f_ω (Detachment) hängen von der Anzahl der Zellen, die sich in den jeweiligen Umgebungen befinden ab. Ist die Kapazität der freien Stellen nahezu erschöpft, können sich wenige Zellen an dieses Kompartiment binden. Die Übergangskurven lassen sich als sigmoide Funktionen darstellen.

Die Formel lautet:

$$f(x) = \frac{1}{A + B * \exp(C * x)} + D \quad (6)$$

In Abbildung 5 wird eine solche Funktion graphisch veranschaulicht.

Intensität ω bezeichnet den Übergang von GE-Ω zu GE-A, während es bei α in der umgekehrten Richtung verläuft. Ob eine Stammzelle die Wachstumsumgebung wechselt, hängt

somit von ihrer aktuellen Affinität a , dem Zustand im Zellzyklus und der Zellzahl im System ab.

Das Modell beruht auf innergeweblicher Plastizität. Eine verlorene Eigenschaft kann wieder aufgewertet werden, z.B. die Attachment-Affinity a nimmt beim Differenzieren und Proliferieren ab, kann aber bei Anbindung an Stromazellen wieder vergrößert werden.

3.2 Simulationsexperimente am Computer

3.2.1 Modellparameter

Um eine Simulation durchzuführen, werden alle für das Modell relevanten Parameter (Tabelle 1) benötigt. Diese werden in einer Eingabedatei zu Verfügung gestellt und bei der Initialisierung des Programms eingelesen. Das implementierte Modell ist für Simulationen eines Systems mit maximal zwei unterschiedlichen Zelltypen ausgelegt. Diese erhalten die Bezeichnung Typ A oder Typ B. Die Parameter a_{min} und a_{max} beziehen sich auf das gesamte System, die restlichen sind auf den Zelltyp beschränkt.

Parameter	Bedeutung
a_{min}	minimaler Wert der Attachment-Affinität a , Schwellwert für Übergang von Stamm- zu differenzierter Zelle
a_{max}	maximaler Wert der Attachment-Affinity a
initial_a_A: max, min	Intervall zwischen denen die Affinität a der Zellen des Typs A bei der Initialisierung liegt
initial_a_B: max, min	Intervall zwischen denen die Affinität a der Zellen des Typs B bei der Initialisierung liegt
dormant_stem_number	Anzahl der Stammzellen eines Zelltyps im Kompartment GE- Ω bei Initialisierung (ruhende Zellen)
active_stem_number	Anzahl der Stammzellen eines Zelltyps im Kompartment GE-A bei Initialisierung (active Zellen)
diff_number	Anzahl der differenzierten Zellen eines Zelltyps bei Initialisierung
r	Regenerierungskoeffizient des jeweiligen Zelltyps
d	Differenzierungskoeffizient des jeweiligen Zelltyps
τ_c	Länge des Zellzykluses bei Zellen des Typs A und B mit jeweiliger Varianz ($\tau_c = G_1 + S + G_2 + M - Phase$)
S-phase:	Länge des S-Phase-Anteils innerhalb des Zellzykluses
G2+M-phase:	Länge der G2- und M-Phase innerhalb des Zellzykluses

Tabelle 1: relevante Parameter

Die Übergangsintensitäten α und ω werden nicht direkt angegeben, sondern mit Hilfe der Funktionen f_α und f_ω ermittelt. Für die Bestimmung der Übergangskurven werden fünf Parameter angegeben. Als Beispiel wurden in der Tabelle 2 die Parameter für die Detachmentkurve einer Referenzmaus angegeben.

Abbildung 5 zeigt die graphische Darstellung einer solchen Funktion, die mit Hilfe der angegebenen Stützwerte und der implementierten Funktionsgleichung (Formel 6) ermittelt

Parameter	f_{min}	$f_{halfnorm}$	f_{norm}	f_{max}	$normnumber$
Wert	0.5	0.3	0.1	0	80

Tabelle 2: Beispielwerte einer Übergangskurve

wurde. Der Wert für $normnumber$ wird benötigt, um den zweiten Punkt auf der Kurve zu

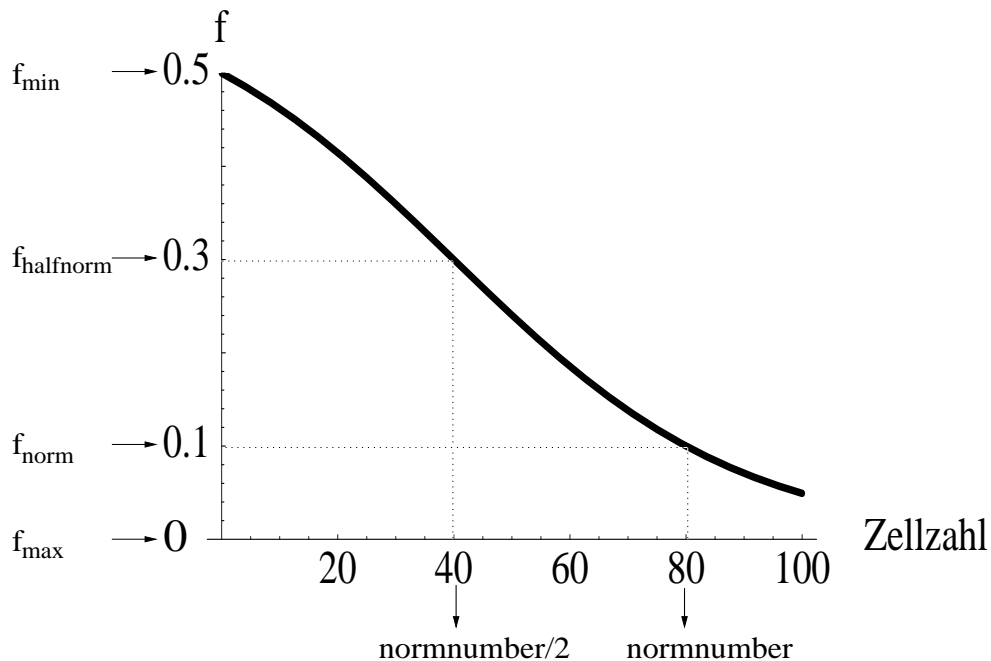


Abbildung 6: Beispiel einer Übergangskurve

erhalten (erster ist f_{min} , die Schnittstelle mit der y-Achse), um die exakte Funktionsgleichung zu bestimmen.

3.2.2 Allgemeine Durchführung

Für diese Arbeit stand mir ein Computerprogramm zur Verfügung, welches die Umsetzung des theoretischen Konzepts des dynamischen Modells aus Abschnitt 3.1 ist. Die Algorithmen wurden in der Computersprache C++ implementiert.

Bevor das Programm starten werden kann, werden zwei zusätzliche Dateien benötigt. Die Eingabedatei enthält die oben aufgelisteten Parameter und Daten. Die Sequenzdatei legt den Ablauf einer Simulation fest, wobei die Initialisierung, die Simulationsdauer und der Befehl „end“ unbedingt anzugeben sind. Bei der Initialisierung werden die Werte aus der

Eingabedatei ausgelesen. Während einer Simulation ist es möglich, Daten den Zell- oder Poolstatus auf den Bildschirm ausgeben zu lassen oder sie in eine Ausgabedatei zu speichern. Es können Zellen transplantiert (Sequenzbefehl: `transplant_pools`) oder abgetötet (Sequenzbefehl: `kill_all_types`) werden. In der Tabelle 3 sind alle Anweisungen einer Sequenzdatei aufgelistet, welche im Laufe dieser Arbeit verwendet wurden.

Befehl	Bedeutung
initialisierung	Initialisierung der Simulation durch Auslesen der Eingabedatei
simulation 10000	Angabe der Simulationsdauer in Stunden und Durchführung der Aktualisierung der Zellen zu jedem Zeitschritt Δt
show_pool_status	Anzeige der aktuellen Größe aller Pools auf den Bildschirm
write_pool_status	Speicherung der aktuellen Größe aller Pools in der Outputdatei <code>scm.user.out</code>
write_cell_status	Speicherung des Statuses aller Stammzellen in die Datei <code>scm.status</code>
save_pools 0.5 trans	Sicherung von 50% des Zellpools in das maschinenlesbare File <code>trans</code> , wobei die Zellen von einem Zufallsgenerator ausgewählt werden
transplant_pools trans	Erzeugung von Zellen entsprechend der Angaben aus der Datei <code>trans</code> und Einfügung dieser in den entsprechenden Pool (gleiche Struktur des Files wie in <code>save_pools</code>)
kill_all_types 80	Löschung aller Zellen mit einer Wahrscheinlichkeit von 80%, Auswahl der Zellen mit Hilfe eines Zufallsgenerators
end	Beenden des Programms

Tabelle 3: relevante Optionen in der Sequenzdatei

Bei jedem Durchlauf des Programms wird eine Ausgabedatei `scm.out` erzeugt. Diese beinhaltet die Anzahl der aktiven und schlafenden Stammzellen, sowie die der differenzierten Zellen, zu jedem Zeitschritt ($\Delta t = 1$ Stunde) in Spaltenschreibweise.

Weitere Ausgabedateien können durch Sequenzanweisungen `write_cell_status`, `write_pool_status` oder `save_pools` entstehen.

In vielen Experimenten wird die Varianz oder das mittlere Verhalten von mehrfach durchgeführten Simulationen bei gleichbleibenden Initialwerten untersucht. Es werden bis zu $n = 100$ Simulationen mit unveränderten Parametern durchgeführt, um auswertbare Ergebnisse zu erzielen. Die Schätzung für den wahren Mittelwert ist für $n = 100$ Durchführungen genauer, als bei wenigen Simulationen. Die Anzahl der benötigten `scm.out`-Dateien sollte der Anzahl der durchgeführten Simulationen entsprechen. Weitere Ausgabedateien könn-

ten abgespeicherte Pools bzw. den Zell- oder Poolstatus einzelner Simulationen enthalten. Diese Dateien werden für die Auswertung benötigt. Die mehrfachen Wiederholungen der Programmaufrufe per Hand ist ein arbeits- und zeitaufwendige Verfahren.

Ein weiteres Problem tritt bei den ausgegebene *scm.out*-Dateien auf. Beträgt die Simulationsdauer t Stunden (z.B. $t = 10000$), enthält die ausgegebene *scm.out*-Datei $t + 1$ Zeilen (Zeitpunkt der Initialisierung und t Zeitschritte). Oftmals werden aber nur die Daten von bestimmten Zeitpunkten benötigt. Mit Hilfe eines Perlskriptes (Anhang A.1) werden Mehrfachsimulationen automatisiert, die Ausgabedateien umbenannt und die überflüssigen Zeitpunkte gelöscht. Auf diese Weise wird Speicherplatz eingespart. Dem Skript werden zwei Argumente übergeben: die Anzahl der Simulationen pro Eingabedatei und die Anzahl der vorhandenen Eingabedateien.

Für die Datenauswertung wurden verschiedene Softwareprodukte benutzt. Graphischen Darstellungen wurden mit *Mathematica*, *Gnuplot* oder der statistischen Programmierumgebung *R* erstellt, statistische Berechnungen mit *SPSS*. Zusätzliche Perlskripte (Anhang A.2) waren notwendig, um die Daten in der für das jeweilige Programm lesbare Form bereitzustellen.

Bei einer Transplantation von Stammzellen von einem Wirtstier in das andere muss im Computermodell die Aktivierung der schlafenden Zellen berücksichtigt werden. Hierbei wird die Bezeichnung der Zellen von *dormant* auf *active* gesetzt (siehe Perlskript Anhang A.3). Dies ist notwendig, weil bei *in vivo*-Experimenten die übertragenen Stammzellen zu Zeitpunkt der Transplantation noch nicht ans Stroma (*GE – A*-Umgebung) gebunden sein können.

3.2.3 Durchführung des ersten Teilexperimentes

Durch Computersimulationen soll herausgefunden werden mit welchen Parameterwerten es möglich ist eine große Variabilität in den Zeitverläufen zu erzeugen. Aufgrund der stochastischen Prozesse innerhalb der Hämatopoese, ist es notwendig, mehrere Simulationen mit der gleichen Eingabe- und Sequenzdatei durchzuführen. Aus vorherigen Experimenten ging hervor, dass die Bindungsneigung a und die Stammzellzahl bei der Initialisierung einen Einfluss auf Zeitverläufe hinsichtlich der Heterogenität aufzeigen. Zuerst werden je 100 Simulationen mit den Parametern aus den Szenarien A.1 bis B.6 (Tabelle 6 aus Abschnitt 4.3.1) vorgenommen. Dazu werden zwölf durchnummerierte Eingabedateien benötigt. Die

Sequenzdatei beinhaltet die Initialisierung, die Simulationsdauer von 5760 h (= 8 Monate) und eine Abspeicherung des Zellpools in eine Datei. Mit Hilfe des dafür vorgesehenen Perlskripts werden die jeweiligen Ausgabedateien ebenfalls durchnummeriert abgespeichert. Bei der Sicherung der scm.out-Dateien werden nur die relevanten Zeitpunkte berücksichtigt und für das Computerprogramm R aufbereitet. Die festgelegten Messzeitpunkte sind im ersten, dritten, fünften, siebenden und achten Monat. Für die Zeitpunkte sind nur die Angaben zu den Anteilen der differenzierten Zellen des Typs A, der den B6-Spenderzellen im Blut entspricht, von Bedeutung. Dazu werden die Spalten für die differenzierten Zellen benötigt.

$$\text{Anteil der Zellen des Types } A = \frac{\# \text{ differenzierter Zellen von Typ } A}{\# \text{ differenzierter Zellen von Typ } A + \text{ Typ } B} \quad (7)$$

Für eine übersichtlichere graphische Darstellung werden zufällig 15 von den 100 Zeitverläufen ausgewählt und mit R bearbeitet. Die abgespeicherten Zellpools werden für den nächsten Abschnitt des Experimentes gebraucht.

3.2.4 Durchführung des zweiten Telexperimentes

Die Aufgabe ist, zu prüfen, ob eine modellbasierte Erklärung für die beobachteten ähnliche Verläufe bei Mäusen, die den gleichen Zellklone erhalten haben, und für langfristige Trends gefunden werden kann. In diesen Telexperiment erhält das Empfängertier 5×10^6 Knochenmarkzellen. Das Transplantat enthält somit ungefähr 50 Stammzellen (1 Stammzellen in 10^5 Knochenmarkzellen [6]). Diese Menge ist erheblich größer in Vergleich zu der Anzahl der Zellen, die in die primären Wirtstiere injiziert wurden. Da aber die Unsicherheit des Schätzers berücksichtigt werden muss, wurden verschiedene Szenarien getestet. Es wurde angenommen, dass die Anzahl der Stammzellen in einem solchen Transplantat zwischen 5 bis 50 Stammzellen liegt. Aufgrund dieser Annahme wird die Simulation auch mit einer Transplantatgröße von ungefähr 5 Zellen durchgeführt. Die dazu benötigten Zellen werden aus den abgespeicherten Zellpools aus Teil 1 entnommen. Dieser enthält ca. 200-250 Stammzellen. Mit Hilfe von Perlskripten werden die Stammzellen des primären Wirtes in vier Teile geteilt und in Dateien gespeichert, wobei eine Datei entweder zufällig ausgewählte 25% (ca. 50 Stammzellen) oder 2,5% (ca. 5 Stammzellen) erhält. Zusätzlich findet die Aktivierung von ruhenden Zellen statt, indem der Zellstatus dormant auf aktiv gesetzt wird.

Die Sequenzdatei beinhaltet die Anweisungen für die Initialisierung, die Transplantation der aktiven Zellen, die Simulationsdauer von 5760 h (= 8 Monate) und dem Programmieren-

de. Mit jeder der vier Dateien, welche die aufgeteilten Stammzellen enthalten wird eine Simulation durchgeführt. Der Befehl in der Sequenzdatei für die Transplantation lautet: `transplant_pools trans`. Dabei werden der Regenerierungs-, der Differenzierungskoeffizient, die Attachment- oder die Detachmentkurve für einen Zelltyp geändert, um die Konkurrenzprozesse in dem sekundären Wirt zu beobachten. Mit einem ähnlichen Perlskript wie im ersten Teilexperiment werden die Werte zu wichtigsten Messpunkt aus der `scm.out`-Datei abgespeichert und für R transformiert. Die festgelegten Messzeitpunkte sind im ersten, dritten, fünften, siebenden und achten Monat während der Simulation, dies entspricht dem neunten, elften, dreizehnten, fünfzehnten und sechzehnten Monat im *in vivo*-Experiment.

Es wird eine Änderung der Ausgangssituation im sekundären Wirt vorgenommen (Annahme: Zelltyp des primären Tieres wächst nicht, trotz Bestrahlung bleiben einige Stammzellen des sekundären Wirtes erhalten). Dafür wird eine Maus mit den Referenzparametern simuliert, bei der 95% bzw. 99% der Zellen abgetötet werden (Sequenzbefehl: `kill_all_types 95`). Die Transplantate für die sekundären Wirte werden wie bei der anderen Ausgangssituation hergestellt. Nur die Zellen des $W^{41}W^{41}$ -Typs werden entfernt.

Wiederum wurde der Anteil der B6-Spenderzellen im Blut gemessen, was in der Simulation den Anteil der differenzierten Zellen Typ A (Formel 7) entspricht und stellte die Zeitverläufe graphisch dar.

3.3 Modellannahmen

Der Aufbau der *in vivo*-Experimente und die Erkenntnisse anderer Experimente dienen als Grundlage zur Entwicklung von Modellszenarien. Für die Nachbildung der Zeitverläufe der Mausexperimente müssen die Modellparameter angepasst werden. Um die jeweiligen Computersimulationen durchführen zu können, wird die Eingabedatei mit den Parametern und ihren Werten benötigt. Für den B6-Maustyp wurde ein Parametersatz festgelegt, der bei den Simulationsexperimenten als feste Bezugsgröße gewählt wurde. Als Beispiel wurden die Parameter für ein Referenzszenario, der sogenannten Normmaus, zur Verfügung gestellt. Diese Daten wurden aus der Literatur entnommen oder durch vorherige Simulationsexperimente ermittelt. Es war notwendig, einige der Parameterwerte zu ändern, um die Ergebnisse der Mausexperimente reproduzieren zu können. Alle Parameter, die bei den Modellsimulationen konstant gewählt wurden, sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Während der Untersuchungen wurde darauf geachtet, dass so wenige Parameter wie möglich geändert wurden, um adäquate Ergebnisse zu erzielen.

Parameter	Wert
a_{min}	0.01
a_{max}	1
initial_a_A/B:	min: 0.1 max: 1
dormant_stem_number	Typ A: 0, Typ B: 0
active_stem_number	Typ A: 1 Typ B: 0
diff_number	Typ A: 0 Typ B: 0
r	Typ A: 1.1 Typ B: 1.1
d	Typ A: 1.07 Typ B: 1.07
τ_c	Typ A: 24 Typ B: 24
S-phase	Typ A: 8h Typ B: 8h
G2+M-phase	Typ A: 4h Typ B: 8h

Tabelle 4: Parameter der Referenzmaus

Funktion	Zelltyp	f_{min}	$f_{halfnorm}$	f_{norm}	f_{max}	$normnumber$
Attachment	Typ A	0.5	0.3	0.01	0	400
	Typ B	0.5	0.3	0.01	0	400
Detachment	Typ A	0.5	0.3	0.1	0	80
	Typ B	0.5	0.3	0.1	0	80

Tabelle 5: Parameter der Übergangsfunktionen für Normmaus

Die Zeitverläufe des ersten *in vivo*-Teilexperimentes zeigen eine starke klonale Heterogenität bei “Einzel“-Transplantation. Diese soll mit Hilfe eines Computermodells reproduziert werden.

Die Spenderzellen wurden einer B6-Maus entnommen. Die Parameter einer solchen Zelle entsprechen der einer Normmaus und werden für alle Simulationen konstant gehalten. In der Stromalinie S17 entwickelt sich aus je eine Spenderstammzelle eine vier Wochen alte Zellkultur, die in das primäre Empfängertier transplantiert wird. Bei einem Transplantat muss darauf geachtet werden, das ruhende Zellen aktiviert werden, weil die transplantierten Stammzellen erst anwachsen müssen. Vorher befinden sie sich frei und aktiv im System.

Es wird angenommen, dass dieses Transplantat aus Nachkommen nur einer Stammzelle besteht. Da unbekannt ist welche Eigenschaften diese Stromalinie besitzt, wurden Annahmen getroffen. Entweder die Zellen entwickeln sich wie *in vivo*, oder sie entwickeln sich schlechter bzw. besser. Dies kann mit der Affinität a gesteuert werden. Ein vier Wochen altes Well kann man mit Hilfe einer Simulation erstellen. Wird ein kleines a_{max} gewählt, verharren die ruhenden Zellen kürzer im Stroma und sind schneller bereit wieder aktiv zu werden und zu bleiben (bei Abnahme von a_{max} wird die Übergangsintensität α größer). Die Stammzellen differenzieren schneller aus und somit sind im Vergleich zu großem a_{max} weniger Stammzellen vorhanden. Die Qualität eines Wells kann durch die Festlegung des a für jeden Zelltyp beider Initialisierung angegeben werden. Ist die initiale Bindungsneigung groß, so ist die Chance, dass sie sich ans Stroma binden, auch groß. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Intensitäten zum Wechsel der Wachstums Umgebung von jeweiligen a abhängt (Formel 5). Ruhende Zellen befinden sich immer in der G_0 -Phase der Zykles. Der stammzellpool vermehrt sich langsamer und kann nicht so viele differenzierte Zellen bilden. Bei kleiner Initial-Affinität a sind die Zellen meist aktiv, weil die Intensität ω in diesen Fall groß ist. Dadurch sind sie meist vom Stroma gelöst, und verringern ihr a , so dass sie schnell ausdifferenzieren. Auf diese Weise sind nach nur 4 Wochen weniger Stammzellen im System enthalten, als bei großen Initial- a .

Eine Computersimulation kann mit zwei unterschiedlichen Typen von Zellen initialisiert werden. Die B6-Spenderzellen erhielt die Bezeichnung Typ A und die Zellen des primären Empfängertiers ($W^{41}W^{41}$ -Maus) Typ B. Harrison [7] führte wichtige Repopulationsexperimente mit W -anämischen Mäusen durch. Diese zeigen, das Stammzellen eines Wildtyps immer in einer unbestrahlten $W^{41}W^{41}$ -Maus anwachsen und nach einer gewissen Zeit alle Zellen der Empfängermaus verdrängt haben [5]. Es ist noch ungeklärt welche Mechanismen dieses Verhalten hervorrufen. Der Nachteil bei der Repopulation kommt nur zustande, wenn sie in Konkurrenz mit normalen Mäusestammzellen leben müssen. Eine Annahme ist,

dass eine anämische Maus eine höhere Radiosensitivität besitzt und bei der Bestrahlung mit 5 Gy sich der Anteil der Zellen [4] stark verringert. Da es keine genauen Daten über die Parameter einer $W^{41}W^{41}$ -Mäuse gibt, wurde folgende Annahme getroffen. Die Parameter der primären Empfängertiere entsprechen denen der Referenzmaus, aber die initiale Stammzellzahl wurde ziemlich klein gewählt. Da die Spenderzellen ebenfalls mit den Referenzparametern simuliert werden, haben die wenigen Zellen aus dem Spenderwell weder einen großen Vorteil noch Nachteil.

Im zweiten Telexperiment besitzen die Zeitverläufe unter den unterschiedlichen Klonen ebenfalls eine große Variabilität. Innerhalb eines Klones sind die Kinetiken aber sehr ähnlich.

Aus einem primären Wirt werden je 5×10^6 Knochenmarkzellen in 2-4 Empfängertiere transplantiert. Harrison [6] führte Experimente und Berechnungen durch, die besagen, dass sich bei einer Maus in 10^5 Knochenmarkzellen eine Stammzelle befindet. Daraus ergibt sich, dass ein sekundäres Wirtstier ein Transplantat mit ungefähr 50 Stammzellen erhält. Das ist eine größere Anzahl an Zellen als bei der primären Transplantation. Aufgrund der Unsicherheit des Schätzers für die Stammzellanzahl wird in den Simulationen eine Transplantatgröße zwischen 5-50 Stammzellen angenommen. Die sekundären Empfängertiere werden mit einer hohen Dosis (10.6 Gy) bestrahlt. Down (unpublizierte Daten) behauptet, dass bei einer Transplantation von 2×10^5 Knochenmarkzellen in eine mit 10 Gy bestrahlte Maus nach einiger Zeit keine Zellen des Empfängertieres übrigbleiben, d.h die vorhandenen Zellen sind alle Nachkommen der transplantierten Stammzellen (100% donor engraftment).

Somit sind wiederum nur 2 Zelltypen vorhanden (Typ A: B6-Spenderzellen, Typ B: $W^{41}W^{41}$ -Zellen).

Andererseits stellten Biologen fest, dass die $W^{41}W^{41}$ -Zellen nach der zweiten Transplantation verschwunden sind, aber trotz hoher Bestrahlung immer noch Zellen des zweiten Wirtes vorhanden sind. Auch in diesem Fall gibt es nur zwei Zelltypen (Typ A: B6-Spenderzellen, Typ B: B6-Zellen des sekundären Wirtstieres). Aufgrund dieser widersprüchlichen biologischen Annahmen über das Vorhandensein welches Zelltyps, wurden beide Möglichkeiten simuliert.

4 Resultate

4.1 Parameter und deren Einfluss

4.1.1 Bindungsaffinität a

Die Bindungsaffinität a , auch Attachment-Affinity genannt, gibt an, wie groß die Neigung einer Zelle ist, sich an die Stromabbindungsstellen anzulagern und damit in den Ruhezustand zu gehen. Durch die Angabe von a_{max} und a_{min} wird das Intervall der Werte definiert, welche die Affinität einer Stammzelle während einer Simulation annehmen kann. Wird das Intervall sehr groß gewählt, benötigen die Stammzellen mehr Zeit um ausdifferenzieren zu können. Dadurch erhöht sich die Anzahl der Zellteilungen im GE- Ω -Kompartiment und führt dazu, dass bei mehr Stammzellen im System auch mehr differenzierte Zellen gebildet werden. Wird der Bereich verkleinert, erreicht die Bindungsneigung eher den Minimumwert und die Zellen fallen schneller aus dem Stammzellpool heraus, d.h. weniger Stammzellen und differenzierte Zellen sind im System.

Für die beiden Zelltypen kann unabhängig der Bereich, in dem a bei der Initialisierung liegen kann, angegeben werden. Welchen Wert a innerhalb dieses gewählten Bereiches annimmt, wird mit Hilfe des Zufalls ermittelt. Somit ist es möglich, dass bei Mehrfachsimulationen mit identischen Eingabedateien die Zellen bei der Initialisierung unterschiedliche Attachment-Affinity erhalten. Es ist möglich allen Zellen das gleiche Anfangs- a zu übergeben, indem man die Intervalllänge gegen Null gehen lässt.

Ist $a = a_{max}$, so ist die Intensität α der Zelle am größten. Eine Stammzelle mit dieser Eigenschaft, neigt mit einer großen Wahrscheinlichkeit dazu, sich an die Stromazellen (Modellbezeichnung: GE-A) zu binden. Aufgrund der kleinen Intensität ω verweilen die Zellen für längere Zeit in diesem Kompartiment. Sind alle Affinitäten zu Beginn der Simulation annähernd a_{max} , ist der Anteil der aktiven Stammzellen nach den ersten Zeitschritt sehr klein. Aus diesem Grund nehmen auch wenige Zellen aktiv am Zellzyklus teil, um sich zu vermehren oder auszudifferenzieren bzw. ihr a zu verringern. Die Stammzellanzahl steigt nur langsam an und demzufolge auch die Anzahl der differenzierten Zellen. Ein solches System braucht längere Zeit, um in einen konstanten Zustand zu gelangen. Aber die Wahrscheinlichkeit, dass die Stammzellen aussterben ist gering.

Ist die Bindungsaffinität nahe dem Schwellwert a_{min} , so ist die Intensität α am kleinsten und ω am größten. Dies führt dazu, dass eine Zelle wenig Neigung verspürt, sich an das

Stroma zu binden oder sich von diesem zu lösen als bei hoher Bindungsaffinität. Sind alle Affinitäten zu Beginn der Simulation annähernd a_{min} , ist der Anteil der aktiven Stammzellen nach dem ersten Zeitschritt sehr groß. Da sie den minimalen Schwellwert fast schon erreicht haben, differenzieren diese Stammzellen schneller aus. Im Stroma befinden sich nur wenige regenerierende Stammzellen, d.h. nur wenige Zellen haben die Gelegenheit ihre Bindungsaffinität zu erhöhen. Das System produziert anfangs viele reife Zellen, stirbt aber bei geringer Initialzellzahl mit hoher Wahrscheinlichkeit aus.

4.1.2 Initialzellzahlen

Zu Beginn einer Simulation kann gewählt werden, mit wie vielen Zellen ein System gestartet werden soll. Dabei ist es möglich, die Anzahl der aktiven, der ruhenden und der differenzierten Zellen anzugeben. Meist gibt man aktive Zellen in das System. Es wird davon ausgegangen, dass bei einer Transplantation alle Zellen aktiv sind, da sie sich erst an die Stromazellen binden müssen.

Es ist möglich zwei Zelltypen zu initialisieren. Besitzen diese die gleichen Initialwerte aller Parameter, hat kein Zelltyp einen erkennbaren Vorteil. Sind die Stammzellzahlen dieser beiden Zelltypen sehr klein, besteht die Möglichkeit, dass die wenigen Zellen eines Typs aktiv bleiben und sich vermehren und die des anderen Typs in den Ruhezustand übergehen. Dadurch entwickelt der Zelltyp mit den aktiven Zellen einen kleinen Vorteil, da sich dessen Zellzahl erhöht. Somit kann er die Zellen des anderen Typs verdrängen. Bei der Messung der Zellanteile ist zu erkennen, dass sie stark um 50 Prozent schwanken. Die Initialisierung der Zelltypen mit kleinen Zellzahlen erzeugt eine große Varianz innerhalb der Zellanteile.

Vergrößert man die Initialzellzahl beider Typen, vermindert sich die Variabilität der Zellanteile. Die Varianz um den Mittelwert wird geringer. Dies kommt daher, weil bei einer größeren Anzahl von Zellen sich annähernd gleich viele Zellen jedes Typs an das Stroma binden oder lösen können.

Hat ein Zelltyp mehr Initialstammzellen, so besitzt er einen Vorteil. Bei einer größeren Anzahl an Zellen ist die Nachkommenschaft höher und es können mehr differenzierte Zellen gebildet werden.

4.1.3 Übergangskurven f_α und f_ω

Die Attachmentkurve f_α beschreibt die Fähigkeit des Kompartments GE-A noch Zellen aufzunehmen. Es wird angenommen, dass die Anzahl der Bindungsplätze begrenzt ist.

Befindet sich eine Zelle in dieser Umgebung, kann sie sich regenerieren. Die Funktion f_ω reguliert die den Bedarf an proliferierenden Zellen in der Wachstums Umgebung GE- Ω . Die Zellen in dieser Umgebung nehmen aktiv am Zellzyklus teil und produzieren Nachkommen durch Zellteilung. Auch hier ist die Aktivierungsintensität von der Anzahl der bereits proliferierenden Stammzellen abhängig.

In den Ergebnissen des zweiten Abschnitts des *in vivo*-Experiments sind abfallende und steigende Kurven zu erkennen. Diese sind mit einer Veränderung der Zellzahlen oder der Attachment-Affinity nicht zu erreichen. Für die nachfolgenden Resultate wurde jeweils nur die Attachment- oder die Detachmentkurve geändert.

Zuerst soll allgemein geklärt werden, wie sich die Populationskinetik einer Maus mit einem Zelltyp bei starken Veränderungen der jeweiligen Übergangskurve ändert. Wird nur die Attachmentkurve f_α deutlich angehoben, nimmt die Anzahl der aktiven Stammzellen und der ausdifferenzierten Zellen leicht zu. Der Anteil ruhender Stammzellen steigt sehr stark an. Das lässt sich damit begründen, dass die Zellen weiterhin normal proliferieren können, aber eine größere Chance zum Regenerieren erhalten. Sie können leichter in das Kompartiment GE-A wechseln. Eine mögliche Interpretation ist, dass beim Anheben der Attachmentkurve die Anzahl der zur Verfügung stehenden Bindungsplätze zunimmt. Die gegenteilige Wirkung erzielt man durch Absenken der Attachmentkurve. Die Anzahl der ruhenden Stammzellen nimmt ab. Die Anzahl der aktiven Stammzellen und der differenzierten Zellen nimmt nur leicht ab.

Der Einfluss des Absenkens der Attachmentkurve auf die Zellpopulation ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Abbildung 22 im Anhang zeigt den Einfluss einer angehobenen Attachmentkurve auf die Entwicklung einer Zellpopulation.

Veränderungen in der Detachmentkurve wirken sich auf eine Zellpopulation weniger stark als bei Änderung der Attachmentkurve aus. Senkt man f_ω ab, so verringert sich die Chance für eine Stammzelle, sich von der Stromazelle zu lösen. Dies hat zur Folge, dass die Anzahl der aktiven Zellen abnimmt, während sich bei der Anzahl der schlafenden Zellen wenig Einfluss zeigt. Die proliferierenden Stammzellen produzieren aufgrund ihrer geringeren Anzahl weniger reife Zellen. Bei Anhebung der Detachmentkurve vergrößert sich die Wahrscheinlichkeit, dass eine ruhende Zelle aktiviert wird. Demzufolge ist eine leichte Steigerung der Anzahl der Zellen, die aktiv am Zellzyklus teilnehmen, zu erkennen.

Ein Beispiel für den Einfluss des Absenkens der Detachmentkurve auf die Stammzellpopulation ist in Abbildung 8 dargestellt. In Abbildung 24 im Anhang ist die Auswirkung auf die Entwicklung einer Zellpopulation bei angehobener Detachmentkurve zu sehen.

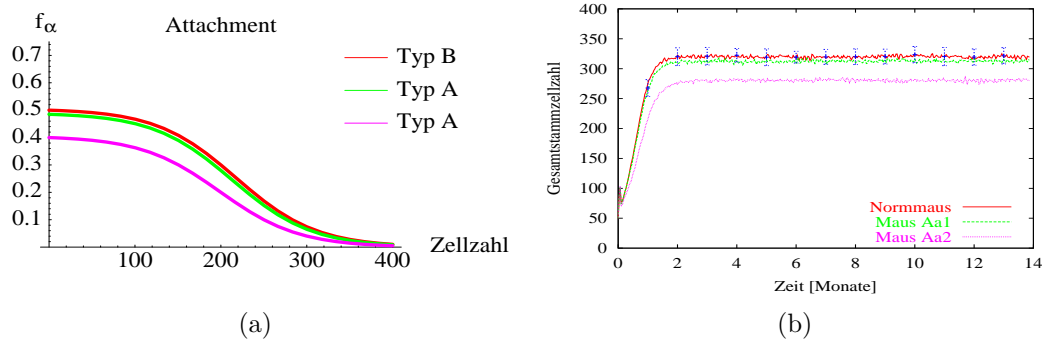


Abbildung 7: Szenario Aa1 + Aa2:(a) Lage zweier abgesenkter Attachmentkurven (grün, pink) im Vergleich zu der einer Normmaus (rot) (b) Entwicklung der Stammzellpopulation für die Normmaus (rot) und zweier Mäuse mit veränderten Attachmentkurven (grün, pink). Dargestellt wurde jeweils der Mittelwert aus 50 Einzelsimulationen. Bei der Normmaus wurde zusätzlich die Standardabweichung des Mittelwerts (blaue Balken) bestimmt. Initialisiert wurde mit 50 Stammzellen

4.1.4 Faktoren r und d

Der Regenerierungskoeffizient r beschreibt den Faktor, mit der sich eine ruhende Zelle pro Zeitschritt Δt erholt. Wird dieser Faktor gesenkt, verlieren die Stammzellen an Qualität. Sie neigen verstärkt dazu das Kompartiment GE-A zu verlassen und differenzieren schneller aus. Die Anzahl der Stammzellen und auch der differenzierten sinkt. Wird die Regenerierungskoeffizient zu klein gewählt, stirbt die Zellpopulation aus. Eine Erhöhung des Faktors r über den angegebenen Referenzwert verändert an der Entwicklung der Zellpopulation nur wenig. Die Gesamtzahl der Zellen steigt nur geringfügig.

Der Differenzierungskoeffizient d beschreibt mit welchem Maß die Attachment-Affinity pro Zeitschritt Δt abnimmt. Wird sie verringert, brauchen die Stammzellen länger bis sie ausdifferenziert sind. Die Gesamtzahl der Zellen nimmt ebenfalls zu. Aufgrund der langsameren Abnahme von a neigen die Zellen dazu sich stärker an das Stroma zu binden und nicht aktiv zu proliferieren. Ein größerer Differenzierungskoeffizient bewirkt das Gegenteil. Der Regenerierungsprozeß kann den schnellen Verlust der Attachment-Affinity nicht ausgleichen. Deshalb nimmt die Gesamtzellzahl ab. Bei einem d , welches größer als r ist, kann es zum Aussterben des Systems führen.

Die Abbildung 9 zeigt welche Veränderungen die Verringerung der Regenerierungskoeffizient bzw. der Differenzierungskoeffizient bewirkt. Die Auswirkungen einer Erhöhung der beiden Raten zeigt die Abbildung 25 im Anhang.

Der Einfluss der Bindungskurven und der Regenerierungs- bzw. Differenzierungskoeffizient

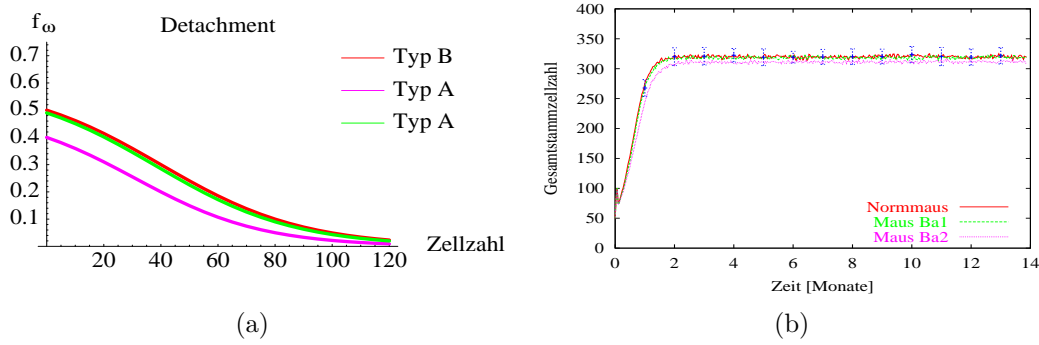


Abbildung 8: Szenario Ba1 + Ba2:(a) Lage zweier abgesenkter Detachmentkurven (grün, pink) im Vergleich zu der einer Normmaus (rot) (b) Entwicklung der Stammsamzellpopulation für die Normmaus (rot) und zweier Mäuse mit veränderten Detachmentkurven (grün, pink). Dargestellt wurde jeweils der Mittelwert aus 50 Einzelsimulationen. Bei der Normmaus wurde zusätzlich die Standardabweichung des Mittelwerts (blaue Balken) bestimmt. Initialisiert wurde mit 50 Stammzellen.

wurde hier für Mäuse mit einem Zelltypen beschrieben. Da in den *in vivo*-Experimenten meist zwei Zelltypen kongurieren, war es von Nöten, dass ein Normzelltyp mit einem veränderten Zelltyp in Konkurrenz gesetzt werden musste.

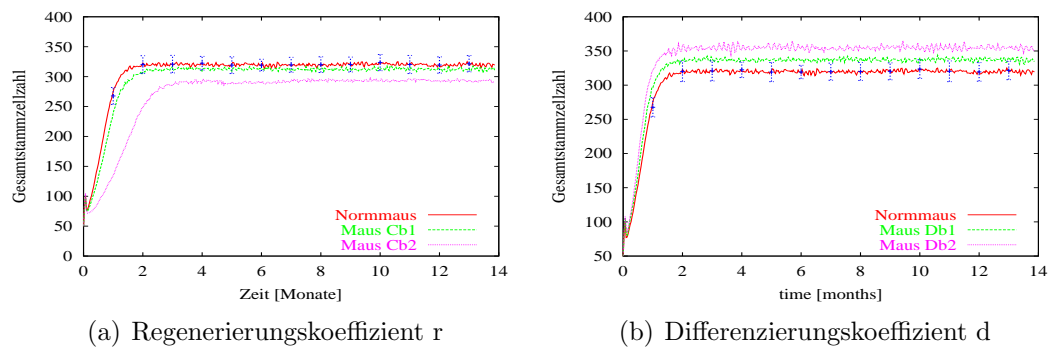


Abbildung 9: (a) Regenerierungskoeffizient r : Entwicklung der Stammzellpopulation für die Normmaus mit $r(B)=1.1$ (rot) und zweier Mäuse mit $r(A)=1.05$ (grün) bzw. $r(A)=1.02$ (pink), (b) Differenzierungskoeffizient d : Entwicklung der Stammzellpopulation für die Normmaus mit $d(B)=1.07$ (rot) und zweier Mäuse mit $d(A)=1.065$ (grün) bzw. $d(A)=1.06$ (pink). Dargestellt wurde jeweils der Mittelwert aus 50 Einzelsimulationen. Bei der Normmaus wurde zusätzlich die Standardabweichung des Mittelwerts (blaue Balken) bestimmt. Initialisiert wurde mit 50 Stammzellen.

4.2 Telexperiment 1

Bei den experimentellen Daten ist in ersten Teilergebnissen eine große klonale Variabilität in den zeitlichen Verläufen hinsichtlich der Anteile reifer Spenderzellnachkommen erkennbar. Um zu untersuchen, in wieweit die Bindungsneigung a und die initiale Stammzellzahl Einfluss auf diese Heterogenität haben, wurden unterschiedliche Szenarien entwickelt. Als Ausgangsparameter wurden die Standardwerte einer Normmaus gewählt.

In den *in vivo*-Experimenten wurde der Anteil der Nachkommen einer Spenderstammzelle im peripheren Blut gemessen. Der Klone der Spenderzellen wird in den Simulationen mit dem Zelltyp A modelliert. Aus diesem Grund wurden bei den Simulationen der Anteil der differenzierten Zellen, die aus den Zelltyp A entstanden, zur Zellzahl aller reifen Zellen bestimmt.

4.2.1 Unterschiedliche initiale Attachment-Affinities und Startzellzahlen

Aufgrund der biologischen Tatsache, dass eine Stammzelle, die in ein S17-Stroma gepflanzt wird, Nachkommen mit annähernd gleicher Qualität wie primäre Knochenmarkzellen hervorbringt, kann annehmen werden, dass die gleiche Verteilung der Bindungsaffinitäten bei den Stammzellen auftritt. Da eine einzige Stammzelle vier Wochen in diesem Stroma verbracht hat, ist anzunehmen, dass sie sich vermehrt hat und reife Zellen hervorgebracht hat. Die entstandenen positive Wells bestehen also aus wenigen Stammzellen und differenzierten Zellen. Diese werden in bestrahlte $W^{41}W^{41}$ -Tiere gepflanzt. Eine Hypothese in bezug auf die anämischen Mäuse ist, dass die Stammzellen dieser Tiere eine höhere Radiosensitivität besitzen als die B6-Standardmäuse. Durch die Bestrahlung verringert sich die Anzahl der Zellen. Aufgrund dieser Tatsache wird die Anzahl der Stammzellen in den positiven Well und in dem primären Wirt auf eine kleine Menge (ungefähr zwischen 1 bis 10) geschätzt. Für die ersten Simulationen wurden die geschätzten Anzahlen der initialen Zellen für beide Zelltypen (Spenderwell, bestrahlter Wirt) festgesetzt, während in späteren Durchführungen simulierten 4-Wochen-Kulturen benutzt wurden. Zuerst wurden die initialen Bindungsneigungen a beider Zelltypen auf $a_{max} = 1$ gesetzt, d.h. die Stammzelle, die aus der Stromalinie S17 entnommen und in den primären Wirt injiziert werden, besitzen eine hohe Qualität. Die Startzahlen der aktiven Zellen wurden bei Szenario A.1 bis A.3 erhöht, wobei das Verhältnis der beiden Zelltypen 50:50 gewählt wurde. Danach sind unterschiedliche Zellzahlverhältnisse (10:90 oder 20:80) gewählt worden. Mit den gleichen Verhältnissen wurde das Experiment wiederholt, wobei die initiale Affinitäten beider Zelltypen $a = 0.1$ gesetzt (Szenario B.1 bis B.6) wurde. Dies ist der Fall, wenn die aus der

Spendermaus entnommene Stammzelle schon ein kleines a besaß und in den vier Wochen im S17 die Zelle sich nicht erholen konnte.

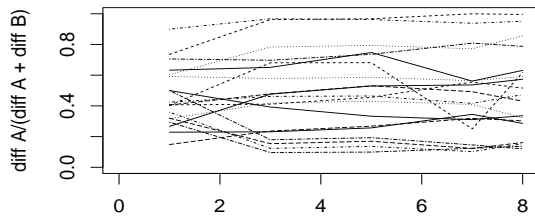
Szenario	initiale Zellzahl	Verhältnis	initil_a_A/B
A.1	Typ A: 1 Typ B: 1	50:50	min: 0.99 max: 1
A.2	Typ A: 2 Typ B: 2	50:50	
A.3	Typ A: 5 Typ B: 5	50:50	
A.4	Typ A: 1 Typ B: 9	10:90	
A.5	Typ A: 2 Typ B: 8	20:80	
A.6	Typ A: 4 Typ B: 16	20:80	
B.1	Typ A: 1 Typ B: 1	50:50	min: 0.099 max: 0.1
B.2	Typ A: 2 Typ B: 2	50:50	
B.3	Typ A: 5 Typ B: 5	50:50	
B.4	Typ A: 1 Typ B: 9	10:90	
B.5	Typ A: 2 Typ B: 8	20:80	
B.6	Typ A: 4 Typ B: 16	20:80	

Tabelle 6: Parameter für die Initialzahlen der aktiven Stammzellen

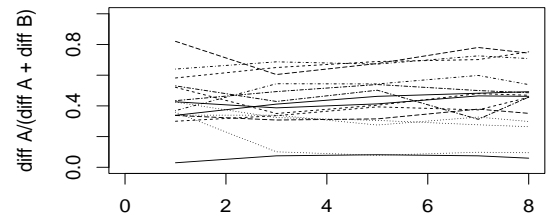
a) maximale Attachment-Affinity $a_{max} = 1$, initiale Attachment-Affinity $a = 1$

Wird ein 50:50 Zellzahlverhältnis bei der Initialisierung gewählt, schwanken die Anteile der differenzierten Zellen um einen Mittelwert von 0.5 (bzw. 50%). Abbildung 10 zeigt, dass bei Erhöhung der Initialzellzahlen die Varianz um den Mittelwert abnimmt. Ist die initiale Attachment-Affinity $a = a_{max}$, wird bei kleinen Anfangszellzahlen eine starke Heterogenität erzeugt. Sie nimmt mit größer werdenden initialen Zellzahlen ab.

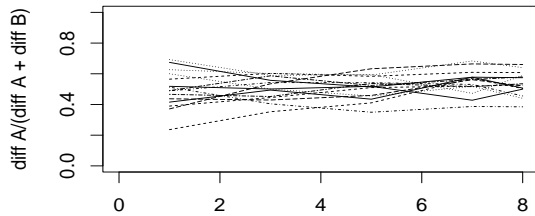
Sind unterschiedliche Zellzahlverhältnisse bei der Initialisierung gewählt worden, verlagert sich der Mittelwert. Nimmt man ein Verhältnis von $t : s$ (Typ A : Typ B) an, streuen die Ergebnisse um den Wert t/s . Die Szenarien A.4 bis A.6 sind Beispiele solcher Verhältnisse (Grafiken siehe Anhang). Erkennbar ist eine Abnahme der Variabilität in den Zellanteilen bei wachsender Anfangsstammzellzahl.



(a) Szenario A.1: Well(A) \Rightarrow 1 Zelle, Wirt1(B) \Rightarrow 1 Zelle



(b) Szenario A.2: Well(A) \Rightarrow 2 Zellen, Wirt1(B) \Rightarrow 2 Zellen



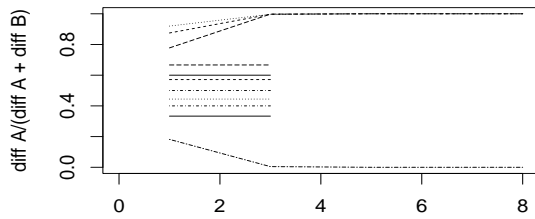
(c) Szenario A.3: Well(A) \Rightarrow 5 Zellen, Wirt1(B) \Rightarrow 5 Zellen

Abbildung 10: Verläufe bei gleicher Initialstammzellzahl beider Zelltypen und maximal wählbarer initialer Attachment-Affinity von 1: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

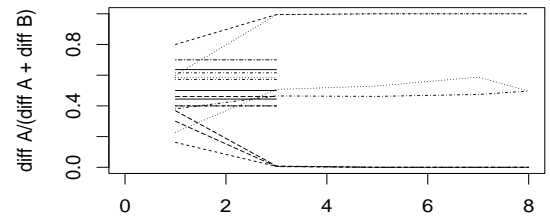
b) maximale Attachment-Affinity $a_{max} = 1$, initiale Attachment-Affinity $a = 0.1$

Besitzen die wenigen Stammzellen zu Beginn der Simulationen eine kleine Anfangsaffinität, hat dies meist zur Folge, dass sie eine gewisse Zeit differenzierte Zellen hervorbringen, aber dann das System ausstirbt. Diese Daten wurden zensiert. Da keine reifen Zellen mehr gebildet werden, ist anzunehmen, dass der Stammzellpool dieses Zelltyps leer ist. Bei wenigen Simulationen ist zu erkennen, dass einer der Zelltypen überlebt. Die Möglichkeit, dass beide Zelltypen das System repopulieren, tritt nicht auf. Wird die Stammzellzahl bei der Initialisierung vergrößert, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass einer oder beider Zelltypen überlebt. Die Abbildungen 11 und 20 (im Anhang) zeigen, dass bei steigender Initialzellzahl die Anteile sich langsam den Mittelwert annähern. Das Wertespektrum verlagert sich von den Randwerten (Überleben von nur einem Zelltyp) immer mehr zu den mittleren Werten.

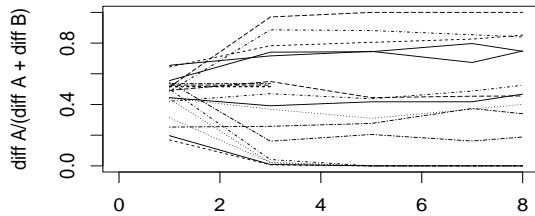
Wurde die initiale Affinität a groß gewählt, wird eine kleine Anzahl an Stammzellen benötigt, um eine große Heterogenität hinsichtlich der zeitlichen Verläufe der Anteile eines Zelltyps zu erzeugen. Bei kleinem initialem a muss die Anzahl der Stammzellen größer gewählt werden, um eine große Variabilität innerhalb der Anteile der differenzierten Zellen des Typs A zu erhalten.



(a) Szenario B.1: Well(A) \Rightarrow 1 Zelle, Wirt1(B) \Rightarrow 1 Zelle



(b) Szenario B.2: Well(A) \Rightarrow 2 Zellen, Wirt1(B) \Rightarrow 2 Zellen



(c) Szenario B.3: Well(A) \Rightarrow 5 Zellen, Wirt1(B) \Rightarrow 5 Zellen

Abbildung 11: Verläufe bei gleicher Initialstammzellzahl beider Zelltypen und initialer Attachment-Affinity von 0.1: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten, starben beide Zelltypen vor Ende der Simulationsdauer aus, wurden ihre Daten zensiert (Verläufe, die im 3. Monat enden)

4.2.2 Unterschiedliche attachment-affinities im LTC-IC

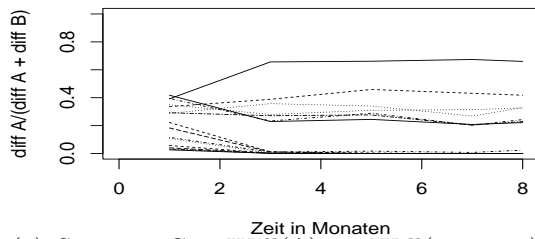
Nachdem der Einfluss der Anzahl der initialen Zellen und der Bindungsneigung a auf die Variabilität untersucht wurde, ist die Transplantation von Stammzellen, die 4 Wochen auf der Stromalinie S17 kultiviert wurden, simuliert worden. Da die wahre Regenerationskapazität der *in vitro*-Kultur auf dem S17-Stroma unbekannt ist, wurden 2 Szenarien angenommen. Es wird behauptet, dass die Repopulationskapazität der herangezüchteten Zellen aus dem S17 annähernd der von frisch entnommenen Knochenmark entspricht. Die Verhalten der Zellen im S17 wurde einmal mit maximal erreichbare Affinität $a_{max} = 1$ (*in vitro*-Kultur entwickelt sich wie *in vivo*) und das andere Mal mit $a_{max} = 0.5$ (*in vitro*-Kultur entwickelt sich schlechter als *in vivo*) simuliert. Die Wells wurden mit einer aktiven Stammzelle initialisiert. Bei Simulationen der Kulturen im S17 mit $a_{max} = 0.5$ entwickelten sich nur ca. 30% zu positiven Wells. Im Fall von $a_{max} = 1$ waren es ca. 50% an positiven Wells. Die positiven Wells, deren Zellen die Möglichkeit hatten, ihre Affinität a auf $a_{max} = 1$ zu regenerieren, besaßen nach 4 Wochen Simulationsdauer zwischen 1 bis

10 Stammzellen mit einem a zwischen 0.01 und 1. Die Kolonien mit der niedrigeren maximalen Attachment-Affinity ($a_{max} = 0.5$) erhielten nach vier Wochen 1 bis 8 Stammzellen mit einem a zwischen 0.01 und 0.5.

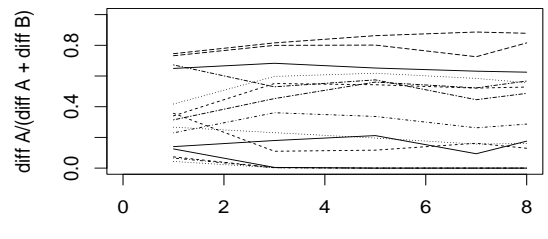
Szenario	active_stem_number	initial_a_B
C.1	Well mit $a_{max} = 1$ (Typ A): 1-10 Typ B: 5	min: 0.99 max: 1
C.2	Well mit $a_{max} = 1$ (Typ A): 1-10 Typ B: 10	
D.1	Well mit $a_{max} = 0.5$ (Typ A): 1-8 Typ B: 5	
D.2	Well mit $a_{max} = 0.5$ (Typ A): 1-8 Typ B: 10	

Tabelle 7: Parameter für die Initialzahlen der aktiven Stammzellen bei vorheriger Well-Entwicklung

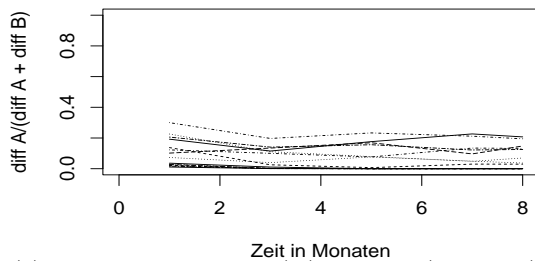
Durch die Simulation eines vier Wochen alten Wells, besaßen die entstandenen Stammzellen unterschiedliche Attachment-Affinities. Den Initialstammzellen im primären Wirt wurden die Affinitäten $a = 1$ gegeben. In Abbildung 12(a) ist zu erkennen, dass die Anteile von A um den Werte 0.4 schwanken (Szenario C.1). Obwohl die Zellen des Typs A (Spender Typ) durch deren höhere Initialzahl einen kleinen Vorteil haben müssten, wird dieser durch die größere Anzahl an Stammzellen mit $a = 1$ zu Beginn der Simulation beim ändern Zelltyp wieder ausgeglichen. Bei Szenario C.2 (Abbildung 12(c)) ist die Initialzahl der aktiven Stammzellen für den Spenderzelltyp geringfügig geringer. Auch hier variieren die zeitlichen Verläufe ungefähr um den Wert 0.4. In Abbildung 12(b)+(d) erkennbar, nimmt das Spektrum der Schwankungen bei größerer Anfangstammzellzahl des Wirts ab. Der Vorteil, den die Zellen des Wirtes aufgrund ihrer höheren Zellzahl und der besseren Affinitäten zu Beginn besitzen, ist hier deutlich sichtbar. Die Mittelwerte der Verläufe, liegen unter dem Startverhältnis der Zelltypen (z.B. Verhältnis 2:10 hat Mittelwert von ca. $0.1 < 0.2$)



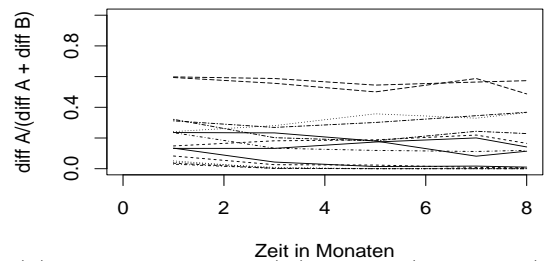
(a) Szenario C.1: Well(A) \Rightarrow Well(amax=1) mit 1-10 Zellen, Wirt1(B) \Rightarrow 5 Zelle



(b) Szenario D.1: Well(A) \Rightarrow Well(amax=0.5) mit 1-8 Zellen, Wirt1(B) \Rightarrow 5 Zelle



(c) Szenario C.2: Well(A) \Rightarrow Well(amax=1) mit 1-10 Zellen, Wirt1(B) \Rightarrow 10 Zelle



(d) Szenario D.2: Well(A) \Rightarrow Well(amax=0.5) mit 1-8 Zellen, Wirt1(B) \Rightarrow 10 Zelle

Abbildung 12: Verläufe bei Transplantationen von 4-Wochen alten Wells mit unterschiedlichen maximalen Attachment-Affinity in eine Maus mit 5 oder 10 Stammzellen ($\hat{=}$ bestrahlter $W^{41}W^{41}$ -Maus : gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

4.3 Telexperiment 2

Im zweiten Abschnitt der experimentellen Ergebnisse wurden annähernd gleiche Verläufe im differenzierten Zellanteil innerhalb der Nachkommen eines Klones gemessen. Bei Vergleich der Kinetiken unterschiedlicher Klone bemerkt man, dass es Unterschiede in den Anstiegen gibt. Es wurden je 5×10^6 Knochenmarkzellen der primären Wirtstiere in die sekundären Empfängermäuse transplantiert. Biologen schätzen, dass in 1×10^5 Knochenmarkzellen sich 1 Stammzelle befindet. Dies ist aber nur eine grobe Schätzung, deshalb wurden 2 Szenarien getestet. Es wird angenommen, dass die Stammzellzahl im Transplantat zwischen 5 und 50 liegt. 50 Stammzellen ist ein maximaler Wert, der kaum auftritt. Aus diesem Grund wurden die Zellen des primären Wirtes (in einer Datei abgespeichert) so in vier Teile aufgeteilt, dass jedes Transplantat ca. 50 Zellen (Maximum) bzw. 5 Zellen (Minimum) besaß (Perlskript siehe Anhang).

Bei den *in vivo*-Experimenten wurden in den sekundären Wirtstieren Anteile der differenzierten Spenderzellen zwischen 0-100% gemessen. Es befinden sich somit nach Bestrahlung und folgender Transplantation mindestens zwei Zelltypen im System. Einerseits stellten die Biologen fest, dass der Zelltyp des primären Wirtes kein Repopulationsverhalten zeigt, andererseits sind laut Down (unveröffentlichte Daten) bei Hochdosisbestrahlung und hoher Transplantationsgröße keine Zellen des Empfängers mehr feststellbar. Aufgrund dieses Widerspruches wurden zwei Transplantationenszenarien entwickelt:

- a) Zelltyp A: B6-Spenderzellen, Zelltyp B: Überleben von $W^{41}W^{41}$ -Zellen
- b) Zelltyp A: B6-Spenderzellen, Zelltyp B: Überleben von B6-Zellen des sekundären Wirtes nach Bestrahlung.

4.3.1 Verläufe bei Zellen ohne zellintrinsische Unterschiede

Die Simulationen mit gleichen Parametern ergeben Verläufe, deren Werte nach einiger Zeit mehr oder weniger konstant blieben (Abbildung 13). Wie auch schon in Telexperiment erkennbar, ist die Variabilität der Kinetiken bei kleinen Zellzahlen größer im Vergleich zu Verläufen mit großen initialen Zellzahlen. Die Verhältnisse der Zelltypen im primären Wirt bleiben auch nach der zweiten Transplantation annähernd gleich. Bei kleinen Anfangszellzahlen variieren die Zellzahlverhältnisse stärker um den Mittelwert (entspricht ungefähr dem Verhältnis der Zellen im primären Wirt im 8. Monat) Die Verläufe führen alle mehr oder weniger in eine Waagrechte. Langfristige Auf- bzw. Abwärtstrends sind nicht erkennbar.

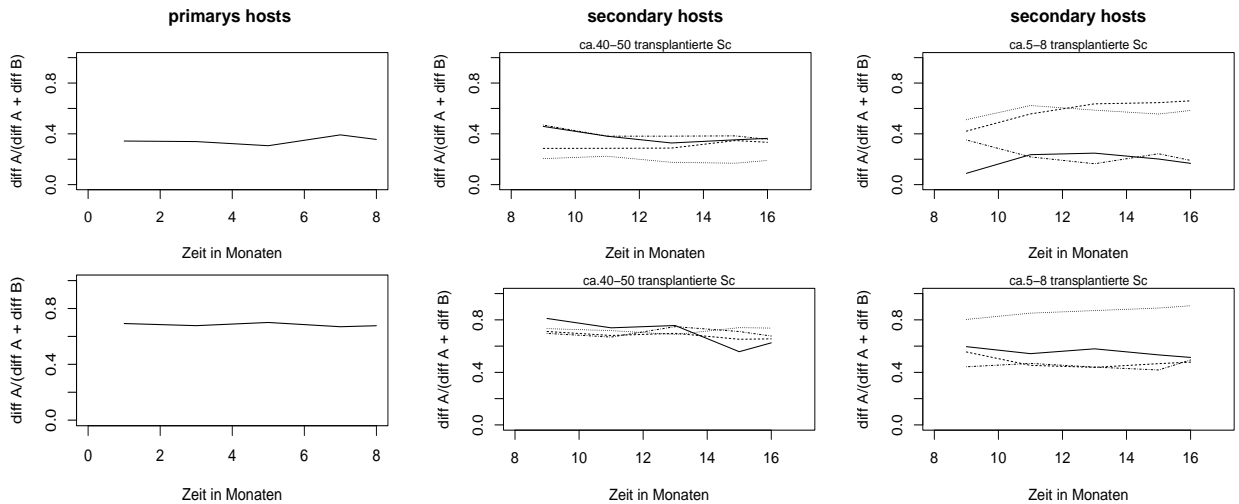


Abbildung 13: Secondary Host wurde mit ca. 50 bzw. 5 Zellen initialisiert und mit Normparametern simuliert: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

4.3.2 Verläufe bei Zellen mit zellintrinsischen Unterschieden

Aufgrund der Tatsache, dass bei Simulationen ohne zellintrinsische Unterschiede keine langfristigen Trends erzeugt werden konnten, wurde versucht mit minimalen Unterschieden in den vererbaren zellulären Eigenschaften (zellintrinsisch) diese fallende oder steigende Kurven herzustellen. Aus vorangegangenen Simulationsprojekten konnte geschlossen werden, dass Änderungen in den Übergangskurven f_α und f_ω , sowie Änderungen in dem Regenerierungs- bzw. Differenzierungskoeffizienten langfristige Trend induzieren könnten. Bei Erzeugung der Trends wurde versucht, jeweils nur einen Parameter für den Zelltyp des Wirtes zu ändern. Es sollten nur minimale Änderungen in den vererbaren zellulären Eigenschaften vorgenommen werden. Dafür wurde getestet, in wieweit eine kleine Parameterabweichung sich auf den Stammzellpool mit einem nur Zelltyp(f_α, f_ω, r, d) im Vergleich zu den der Referenzmaus auswirkt (siehe Abbildungen: Entwicklung der Stammzellpopulation für die Normmaus (rot) und zweier Mäuse mit veränderten Attachmentkurven (grün, pink) im Abschnitt 4.2 und Anhang). Es wurden Simulationen mit nur einen Zelltyp durchgeführt, wobei jeweils einer der 4 Parameter geändert wurde. Für jede Änderung wurde der Mittelwert von 50 Einzelsimulationen berechnet. Diesen verglich man mit dem Mittelwert bei Simulationen mit einer Normmaus. Es wurden jeweils zwei Simulationsreihen mit abgesenkten Werten bzw. mit angehobenen Werten durchgeführt, wobei bei kleineren Parameteränderungen die Entwicklungskurve der Stammzellzahlen innerhalb der Standardabweichung der Referenzmaus liegen sollte.

In den Simulationen wurden der Zelltyp mit den Parametern einer Normmaus und der Zelltyp A mit veränderten Parametern in Konkurrenz gebracht, um deren Verhalten zu beobachten. Getestet wurde, ob die kleine Änderung im Parameter (Entwicklung der Stammzellpopulation liegt innerhalb der Standardabweichung der Referenzmaus) bei Konkurrenzprozessen schon Trends hervorrufen, oder ist es nötig eine größere Parameteränderung anzunehmen.

a) Änderung der Attachmentkurve oder Detachmentkurve

Szenario	f_{min}	$f_{halfnorm}$	f_{norm}	f_{max}	$normnumber$
Normmaus	0.5	0.3	0.01	0	400
Aa1	0.485	0.28	0.0085	0	400
Aa2	0.4	0.2	0.005	0	400
Ab1	0.52	0.32	0.015	0	400
Ab2	0.6	0.4	0.05	0	400

Tabelle 8: Parameter für die Attachmentkurven

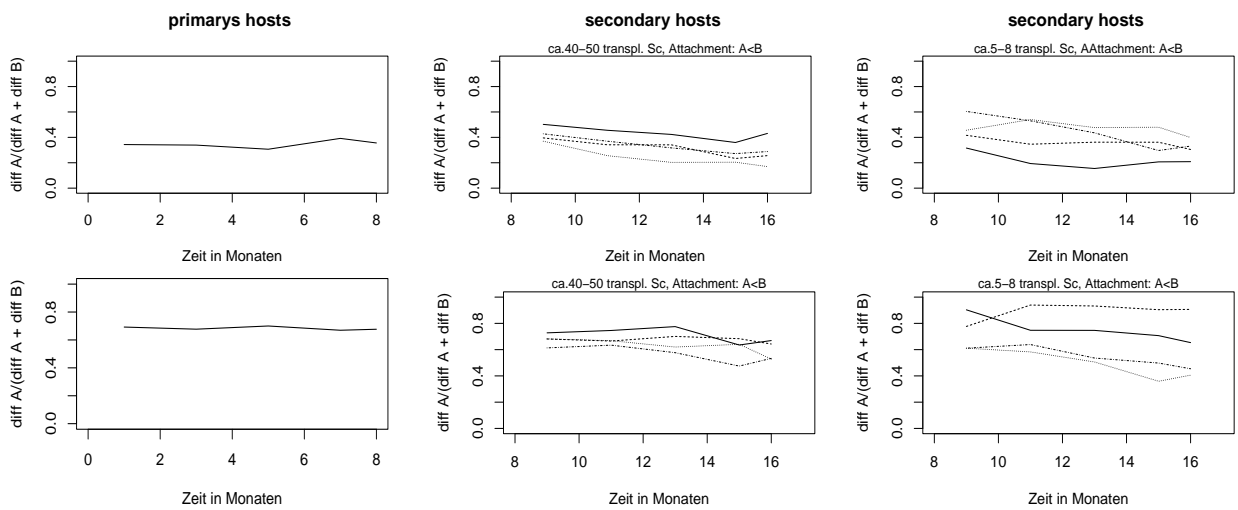


Abbildung 14: Szenario Aa1: Verläufe der Stammzellen mit der Attachmentkurven der A-Zellen ein wenig unterhalb der B-Zellen (Referenzmaus): gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

Die Abbildung 14 veranschaulicht das Szenario Aa1. Dabei ist zu erkennen, dass schon eine kleine Verringerung der Attachmentkurve einen leichten Abwärtstrend verursacht. Bei weiterer Absenkung von f_{α} ist schon ein deutlicher Abfall in den Zellzahlverläufen erkennbar (Abbildung 21 im Anhang). Die Varianz innerhalb der Verläufe vergrößert sich bei kleinen

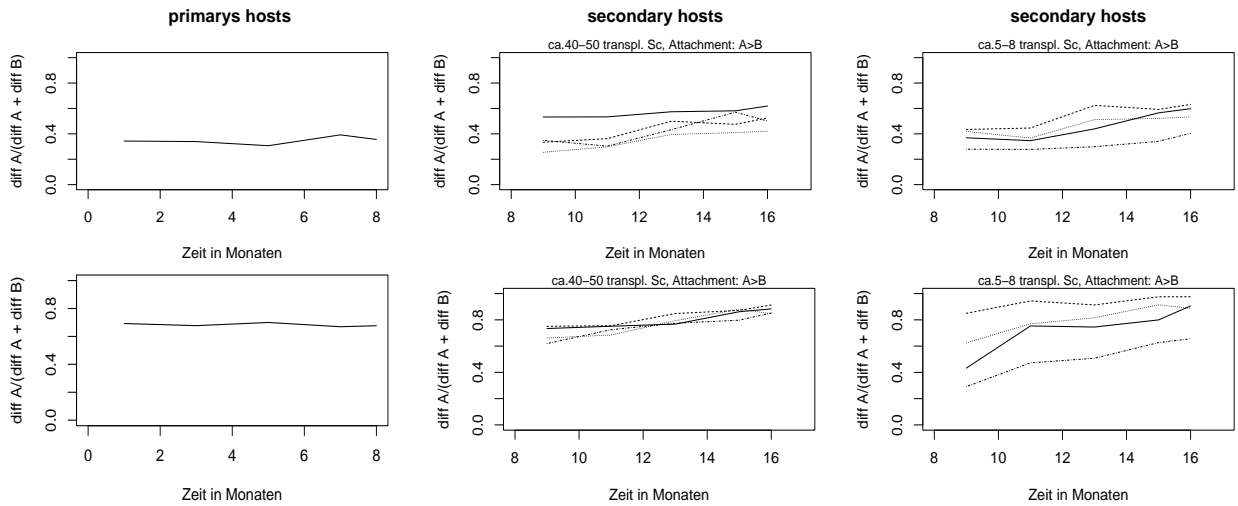


Abbildung 15: Szenario Ab1: Verläufe der Stammzellen mit der Attachmentkurven der A-Zellen ein wenig oberhalb der B-Zellen (Referenzmaus): gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

Anfangszellzahlen. Ein Aufwärtstrend kann durch Erhöhung der Attachmentkurve erreicht werden (Abbildung 15 und 23 im Anhang).

Szenario	f_{min}	$f_{halfnorm}$	f_{norm}	f_{max}	$normnumber$
Normmaus	0.5	0.3	0.1	0	80
Ba1	0.49	0.285	0.09	0	80
Ba2	0.4	0.2	0.05	0	80
Bb1	0.52	0.32	0.12	0	80
Bb2	0.6	0.4	0.2	0	80

Tabelle 9: Parameter für die Detachmentkurven

Tabelle 9 zeigt, mit welchen Änderungen in der Detachmentkurve der Versuch unternommen wurde, Trends zu erzeugen. Weder kleine noch minimale Abweichungen von f_{ω} führten zu sichtbaren Trends. Die Ergebnisse ähneln stark denen ohne intrinsische Unterschiede. Eine Änderung der Detachmentkurve zeigte keinen Einfluss hinsichtlich der Anteile der differenzierten Zellen des Typs A.

b) Änderung der Regenerierungskoeffizient oder Differenzierungskoeffizient

Szenario	r	Szenario	d
Normmaus	1.1	Normmaus	1.07
Ca1	1.2	Da1	1.074
Ca2	1.4	Da2	1.08
Cb1	1.05	Db1	1.065
Cb2	1.02	Db2	1.06

Tabelle 10: Parameter für Regenerierungskoeffizient r und Differenzierungskoeffizient d

Bei einer Verringerung der Regenerierungskoeffizient r für den einen Zelltypen (Szenario Cb1 und Cb2) ist ein Aufwärtstrend in deren Anteil der differenzierten Zellen zu erkennen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Regenerierungskoeffizient nicht unter den Wert 1 sinken darf (Voraussetzung aus den Regeln der Wachstumsumgebung). Schon mit kleinen Änderungen ist ein leichter Abfall der Zellanteile (Abbildung 16) erreichbar. Ein Anstieg in den Kurven wird durch eine Erhöhung von r bewirkt (Abbildungen 27 und 28 im Anhang).

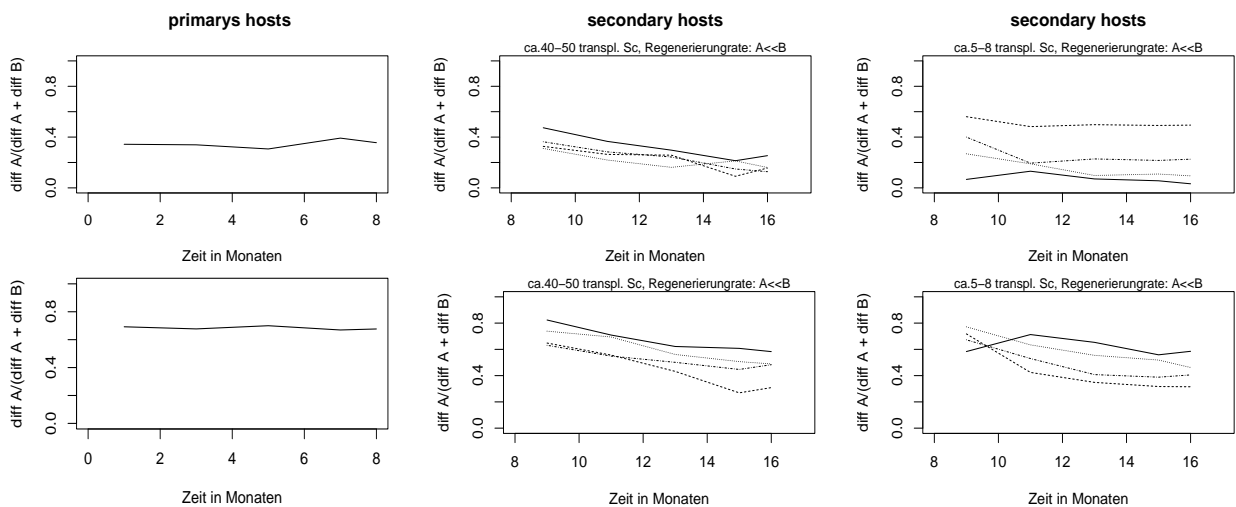


Abbildung 16: Szenario Cb2: Verläufe der Stammzellen mit dem Regenerierungskoeffizient r der A-Zellen kleiner als der B-Zellen (Referenzmaus): $r(A)=1.05$, $r(B)=1.1$: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

Auch Änderungen in des Differenzierungskoeffizient wirken sich auf die Tendenzen in den Zellanteilen bei Konkurrenz aus. Mit einer Verkleinerung von d bewirkt man einen langfristigen Anstieg des Anteils der differenzierten Zellen des Typs A (Abbildung 17). Bei einer Erhöhung dieses Parameters ist eine abfallende Tendenz erkennbar (siehe Anhang Abbildung 29).

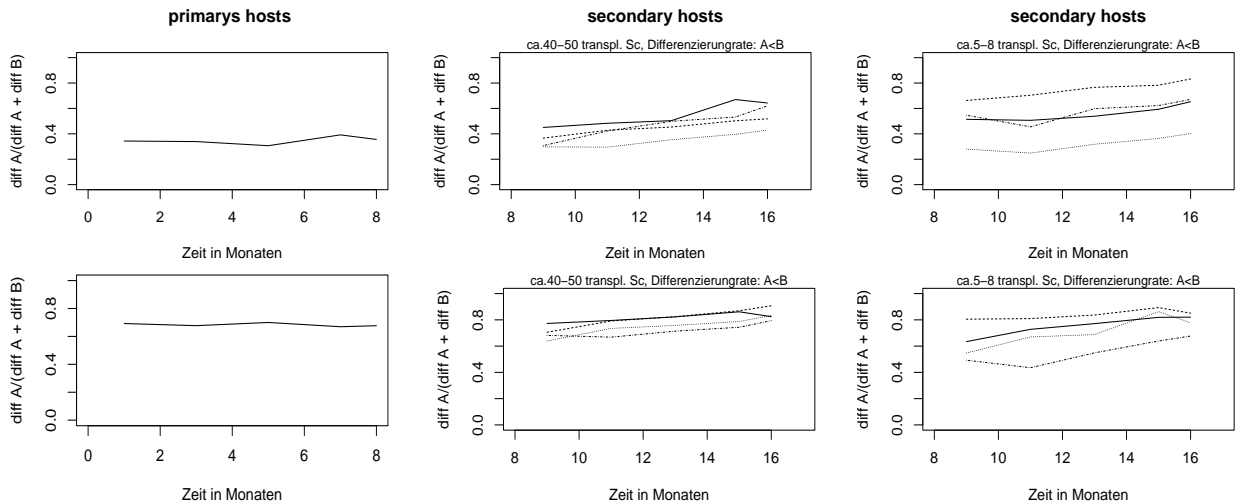


Abbildung 17: Szenario Db2: Verläufe der Stammzellen mit dem Differenzierungskoeffizient d der A-Zellen kleiner als der B-Zellen (Referenzmaus): $d(A)=1.065$, $d(B)=1.07$: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

4.3.3 Verläufe bei Überleben von Zellen des sekundären Empfängers nach Bestrahlung mit 10.6 Gy und Transplantation von Zellen aus primären Wirt ohne Anwachsen der $W^{41}W^{41}$ -Zellen

Es wird behauptet, dass bei den *in vivo*-Experimenten nach der Transplantation in zweiten Wirtstieren keine Zellen des $W^{41}W^{41}$ -Maustyps mehr vorhanden sind. Da aber in diesen Tieren Anteile der Spenderzellen zwischen 0 und 100% gemessen wurden, muss angenommen werden, dass trotz Hochdosisbestrahlung Stammzellen des sekundären Wirtes überlebt haben müssen. Die biologische Annahme, dass die $W^{41}W^{41}$ -Stammzellen im sekundären Wirt nicht anwachsen, wurde auf das Modell angewendet. Durch Abtötung von 95 bzw. 99 Prozent der Stammzellen wurde das bestrahlte Empfängertier simuliert. Das injizierte Transplantat bestand aus 50 oder 5 Stammzellen des B6-Spendertypes (wie schon in den Simulationen zuvor). Es wird der Anteil der differenzierten Zellen des Spendertyps bei der Simulation der Konkurrenz von klonalen Zellen und endogenen Wirtszellen beobachtet. In Abbildung 18 ist eine große Varianz innerhalb der Kohorte eines Klones erkennbar. Die zeitlichen Verläufe zeigen aber keine langfristigen Trends auf. Sie lassen ähnlichen Ergebnissen wie im Szenario aus Abschnitt 4.3.1 (Anwachsen des $W^{41}W^{41}$ -Zelltyps und Abtöten aller Zellen des sekundären Wirtes) erkennen. Mit dieser Ausgangssituation konnten keine steigenden oder abfallenden Tendenzen in den zeitlichen Verläufen simuliert werden. Die Annahme von festen vererbaren Unterschieden (zellintrinsisch) führt zu qualitativ gleichartigen Ergebnissen wie in Abschnitt 4.3.2.

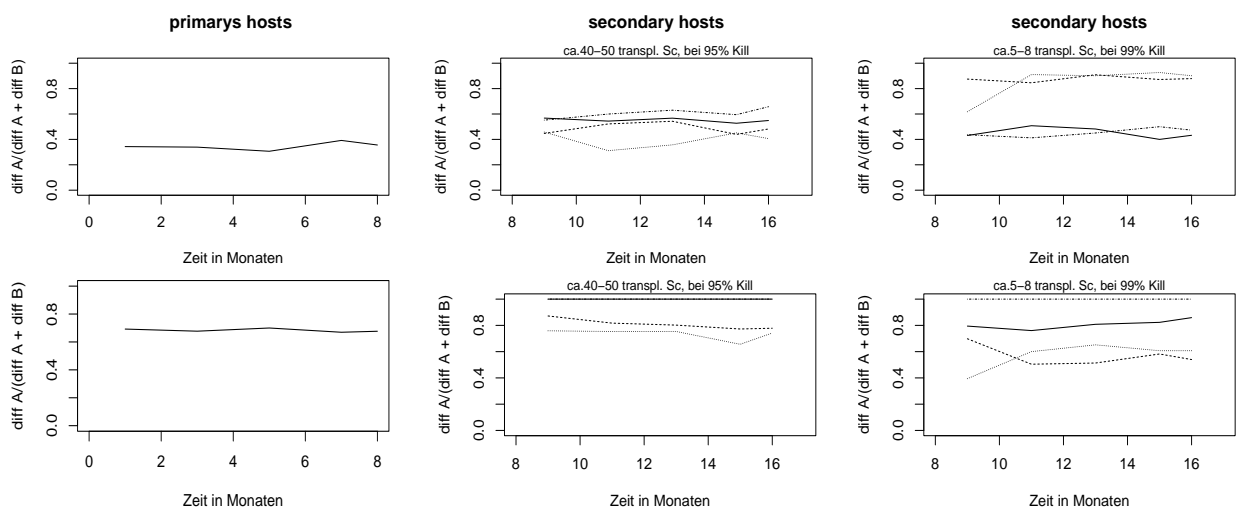


Abbildung 18: Verläufe der Stammzellen mit Zellen des Spenders und des stark bestrahlten sekundären Wirtstieres: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

5 Diskussion

5.1 Auswertung der Simulationsresultate

Das Ziel dieser Arbeit ist die modellbasierte Beschreibung und Erklärung der experimentellen Daten. Dabei soll überprüft werden, ob die Annahme notwendig ist, dass vererbbarer zellintrinsischer Eigenschaften die experimentell beobachteten Phänomene zu erklären. Mit Hilfe des Computermodells wurde untersucht, ob vererbare zelluläre Eigenschaften das Verhalten beeinflussen.

5.1.1 Erstes Telexperiment

Im ersten Abschnitt der Ergebnisse der *in vivo*-Experimente wird eine große Heterogenität hinsichtlich der Anzahl der B6-Spenderzellen im peripheren Blut der Empfängertiere festgestellt. Die Beobachtung ließ sich auf Modellebene mit Hilfe zweier Ansätze reproduzieren. Im ersten Ansatz wurde die Qualität der Zellen beider Mausstämme gleich gewählt, d.h. es wurden keine zellintrinsischen Annahmen getroffen. Besitzt eine Stammzelle eine große Anfangsaffinität, ist anzunehmen, dass ihr Repopulationsverhalten hoch ist. Ist die Anfangsaffinität klein, ist ihr Repopulationsverhalten niedrig. Bei wenigen Initialstammzellen mit großen initialen a war es möglich, eine große Varianz innerhalb des Anteils der differenzierten B6-Zellen zu bewirken. Die Variabilität nimmt bei Erhöhung der initialen Zellzahlen ab. Der Zelltyp, der die größere Initialstammzellzahl besitzt, hat in Konkurrenz einen Vorteil. Er produziert im Vergleich zum andern Zelltyp mit der geringeren initialen Zellzahl mehr differenzierte Zellen. Sind die Stammzellen von minderer Qualität (kleines initiales a), dann muss die initiale Zellzahl ein wenig erhöht werden, um eine große Varianz zu erreichen. Bei kleinen Zellzahlen stirbt das System meist aus (zensierte Daten). Bei weiterer Erhöhung der Zellzahlen sinkt die Variabilität wieder.

Die gewünschte Heterogenität kann allein durch eine geringe Initialstammzellzahl erzeugt werden, ohne dass zellintrinsische Unterschiede vorhanden sind. Aber es wurde damit nicht gezeigt, dass dieses Phänomen ausschließlich ohne vererbare Zelleigenschaften hervorgerufen werden kann. Es ist ebenso möglich, dass zellintrinsische Mechanismen ebenso eine große Variabilität in den Zellverläufen hervorrufen kann. Wie in den experimentellen Ergebnissen des ersten Telexperimentes zu erkennen ist, treten auch hier langfristige Trends auf (Abbildung 3). Diese Beobachtung spricht für eine zusätzliche Annahme von zellin-

trinsischen Unterschieden. Sie wurde aber bei den Simulationen vernachlässigt, weil die Erzeugung von Heterogenität im Vordergrund stand.

5.1.2 Zweites Telexperiment

Die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente des zweiten Teils zeigen ähnliche Verläufe innerhalb der Mäuse, die Zellen des gleichen Klones erhielten. Vergleicht man die Kinetiken von Tieren, welche unterschiedliche Klone erhielten, ist zu erkennen, dass sie wiederum heterogen sind. Einige sekundäre Wirte zeigen langfristige Trends auf.

Die ähnlichen Verläufe innerhalb des gleichen Klones konnten erzeugt werden, indem die Stammzellzahl bei der Initialisierung verhältnismäßig hoch gesetzt wurden. Langfristige Anstiege oder Abfälle in den Kurven sind so nicht reproduzierbar. Diese konnten nur mit Hilfe vererbbarer zellulärer Eigenschaftsunterschieden erreicht werden. Als vererbare intrinsische Parameter sind die Übergangskurven, der Regenerierungs- und Differenzierungskoeffizient betrachtet worden. Bei minimaler Änderung der Attachmentkurve oder des Faktors r war es möglich, einen Trend zu erzeugen. Es konnten langfristige Aufwärts- und Abwärtsverläufe im gleichen Maße erzeugt werden. Differenzierungskoeffizient d und Detachmentkurve hatten wenig Einfluss auf die Konkurrenz. Beim Vergleich der Verläufe ist zu erkennen, dass bei kleiner Menge an Stammzellen im Transplantat die Varianz höher als bei denen mit großer Anzahl an Stammzellen ist.

Durch eine Änderung der Ausgangssituation wurde überprüft, ob es möglich ist, im sekundären Empfängertier zeitliche Entwicklungen von Zellpopulationen zu erzeugen, die einem Trend folgen. Dabei wurde die Annahme aufgestellt, dass die $W^{41}W^{41}$ -Zellen nicht anwachsen und im sekundären Empfänger eine Konkurrenz zwischen klonalen und endogenen Wirtszellen stattfindet. Leider musste bei diesem Versuch festgestellt werden, dass die Kinetiken innerhalb eines Klones eine große Varianz aufwiesen. Außerdem waren keine langfristigen Trends zu beobachten.

Die biologische Annahme lautete, dass die Zellentwicklung schon vorprogrammiert ist und eine Heterogenität nur bei multiklonalen Zellpopulationen erreicht werden kann. Die Simulationsexperimente zeigen, dass das Spektrum der Varianzen in den zeitlichen Verläufen auch mit kleinen initialen Zellzahlen zu erreichen ist. Langfristige Tendenzen benötigen aber minimale intrinsische Unterschiede. Ob der Klon eine Stammzelle einen Vorteil oder Nachteil gegenüber einem anderen Klon besitzt, ist von den winzigen Unterschieden in den vererbten zellulären Eigenschaften abhängig. Es ist nicht voraussagbar, ob ein Klon

„schlecht“ oder „gut“ ist. Es kommt immer auf den Klon an, mit dem er in Konkurrenz steht an.

5.2 Ausblick

5.2.1 Modell und Simulationen

Das benutzte Modell in seiner jetzigen Form ist in der Lage, die experimentellen Daten zu beschreiben und eine plausible Erklärung zu liefern. Das implementierte Computermodell basiert auf der Grundlage eines theoretischen Konzepts, welches die hämatopoetische Stammzellentwicklung vereinfacht darstellt.

Eine Möglichkeit, die Implementation für die Untersuchung von Konkurrenzprozessen zu verbessern, ist die zelltypabhängige Angabe von a_{max} und a_{min} . Dadurch kann permanent die Qualität des einen Zelltyps gegenüber des anderen Zelltyps gemindert werden, ohne andere zellintrinsische Unterschiede anzunehmen. Im derzeitigen Modell sind diese Parameter nur an die Wachstums Umgebung gebunden und somit für jeden Zelltyp gleich. Es ist nur möglich die initialen Affinitäten unterschiedlich zu wählen.

In den Simulationen und den *in vivo*-Experimenten traten Trends auf. Diese waren durch Unterschiede bestimmter Parameter (Attachmentkurve f_α , Regenerierungskoeffizient r und Differenzierungskoeffizient d) bei den Zelltypen erzeugbar. Kleine zufällige Abweichung in diesen Zelleigenschaften innerhalb eines Zelltyps ist nicht möglich. Alle Zellen eines Typs und deren Nachkommen gehören somit zum selben Klon (sind aus der gleichen Stammzelle hervorgegangen und besitzen die gleichen vererbten Parameter). Durch die Angabe von Intervallen oder zufälligen Wahl möglichen Abweichungen wäre es möglich, den Zellen auch innerhalb eines Zelltyps kleine qualitative Vor- oder Nachteile zu geben.

Das Modell kann nur das Verhalten von zwei sich konkurrierenden Zelltypen simulieren. Wenn das Repopulationsverhalten von Stammzellen in einer Maus, die ein Transplantat mit zwei Zelltypen erhält, simulieren werden soll, wäre es nötig, dass mindestens drei Zelltypen implementiert sind (siehe Transplantat aus primären Wirt in sekundären Empfänger).

Die Umsetzung der vorgeschlagenen Erweiterungen im Computermodell würde es ermöglichen, den Aufbau der *in vivo*-Experimente exakter simulieren zu können.

Ein Vorschlag für ein neues Simulationsexperiment wäre das Testen, in welchen minimalen Bereichen die intrinsischen Unterschiede liegen könnten, um kleine Trends in den Zellzahl-

verläufen zu erzeugen. Die Unterschiede sollten so klein sein, dass bei Simulation mit den jeweiligen Zelltyp dieser sich nicht signifikant von denen einer Normmaus unterscheidet.

5.2.2 Experimente

Simulierte Langzeituntersuchungen haben gezeigt, dass die Verläufe der Anteile der differenzierten Zellen des Spender konstante Werte annehmen. Ein *in vivo*-Experimentes, wo die primären Wirte länger als acht Monate beobachtet werden, könnte zeigen, ob diese Modellvorhersage in der Natur bestätigt wird.

Ein weiterer Vorschlag für ein Experiment ist die Verringerung der Anzahl transplantierte Zellen für den sekundären Wirt. Simulationen haben gezeigt, dass die Variabilität der Verläufe innerhalb eine Klones zunehmen müssten.

A Anhang

A.1 Skripte

A.1.1 Simulationsdurchführungen

Die Perlskripte dienen dazu die Arbeit zu erleichtern. Das folgenden Skript führt fortlaufende Simulationen durch. Der Aufruf erfolgt durch den Befehl:

```
perl simulat.pl <Anzahl SimDurchläufe> <Anzahl Inputdateien>.
```

Die Inputdateien müssen in durchnummerierter Folge von 1 bis j Anzahl Inputdateien vorhanden sein. Die Option j Anzahl SimDurchläufe legt die Anzahl der Simulationen pro Eingabedatei fest. Anstatt der am Ende jeder Einzelsimulation entstehende scm.out-Dateien werden verkürzte Files („scm“) abgespeichert. Diese enthalten nur die Werte von relevanten Zeitpunkten und Zelltypen. Sie werden benötigt um für das Programm *R* einlesbare Dateien herzustellen. Dabei werden die verbleibenden Spalten in Zeilenform transformiert. Am Ende beinhaltet eine solche Ausgabedatei die Daten aller Simulationen für eine Eingabedatei.

```
#!/usr/bin/perl -w

# Name der Datei, welche bearbeitet werden soll
$TheFile1 = "scm.out";

# Anzahl der Inputdateien
for ($a=1; $a < $ARGV[1]+1; ++$a) {

    # Dateinamen fuer R-Auswertung
    if($a<=9) {$NewFile1 = "R0$a";}
    if($a>9) {$NewFile1 = "R$a";}

    # Anzahl der Simulationsdurchlaeufe pro Inputdatei
    for ($b= 1; $b < $ARGV[0]+1 ; ++$b) {

        # Namen fuer die verkleinerten Ausgabedateien
        if ($a<=9) {$NewFile2 = "scm0$a\_b";}
        if ($a>9) {$NewFile2 = "scm$a\_b";}

        # Programmaufruf
        if ($a<=9) {system "./scm inp0$a seq";}
    }
}
```

```

if ($a>9) {system "./scm inp$a seq";}

# Oeffnen der scm.out-Datei
open(IN1, $TheFile1) or die "Konnte Datei nicht lesen.\n";

# Schreiben der Werte der 720., 2160., 3600., 5040. und 5760. Zeile
# aus scm.out in die Datei erg.txt,
# weil nur die Werte fuer den 1., 3., 5., 7. und 8. Monat benoetigt;
# Simulationsdauer muss mindestens 5760 Stunden sein
for ($i=1; $i< 5761; $i=$i+1){
    $Line = <IN1>;
    if (($i==720) or ($i==2160) or ($i==3600) or ($i==5040) or ($i==5760)) {
        open(OUT1,'>> erg.txt') or die "Datei nicht offen.\n";
        print OUT1 $Line ;
        close(OUT1);
    }
}

}

# Schreiben der Quotienten 7.Spalte/(7.Spalte+8.Spalte) aus erg.txt in erg1.txt
system "awk '{if((\$$7+\$$8) == 0) print 0;
    else print \$$7/(\$$7+\$$8)}' ergb.txt>>erg1.txt";

# Umbenennen der erg1.txt in die jeweilige scmInp_Sim
unless(rename('erg1.txt','$NewFile2'))
    {print "Datei konnte nicht umbenannt werden.\n"}

# Loeschen der erg.txt
unless(unlink('erg.txt') == 1)
    {print "Datei konnte nicht geloescht werden.\n"}

# Schliessen der scm.out-Datei
close(IN1);

# Oeffnen der jeweiligen scm-Datei
open(IN2, '$NewFile2') or die
    "Konnte Datei nicht lesen.\n";

# Schreiben der Werte aus der Spalte als Zeile
# durch chomp wird Return-Zeichen am Ende der jeweiligen Zeile gel"oscht,
# die 5 Werte durch Tabs getrennt in eine Zeile geschrieben
for ($c=1; $c<6; $c=$c+1){
    $Line = <IN2>; chomp($Line);
    open(OUT2,'>>Zeilen.txt') or die "Datei nicht offen.\n";
}

```

```
        if ($c < 5) {print OUT2 "$Line\t";}
        else {print OUT2 "$Line\n";
              print OUT2 "1\t3\t5\t7\t8\n";
        }
    }

# Schlie"sen der jeweiligen scm-Datei
close(IN2);

#Bildschirmausgabe fuer Status der Simulation
print "\n";
print "a=$a\t";
print "b=$b\t";

} # Ende der For-Schleife fuer b ==> Simulationsdurchlaeufe

# Umbenennen der Zeilen.txt in die Dateien fuer R-Auswertung
unless(rename('Zeilen.txt',$NewFile1))
    {print "Datei konnte nicht umbenannt werden.\n"}

} # Ende der For-Schleife fuer $$ ==> Anzahl der Inputdateien
```

A.1.2 Zufällige Aufteilung der Transplantate und Aktivierung von schlafenden Zellen

Bei einer Transplantation ist darauf zu achten, dass alle schlafende Stammzelle aktiviert werden. In einen vorher abgespeicherten Zellpool ist der jeweilige Status der Zelle angegeben. Nach dem Programmaufruf `perl teilen.pl <Anzahl Inputdateien>` wird der Ausgangszellpool durch zufällige Auswahl halbiert und die differenzierten Zellen entfernt, so dass nur noch Stammzellen enthalten sind. Das Programm durchläuft eine Datei zeilenweise und schaut, ob in einer Zeile der String *dormant* auftritt. Findet es diese Zeichenkette, wird es durch *active* ersetzt.

Aus der Zeile

```
Adormant 1 0 7 1 0.01
```

wird

```
Aactive 1 0 7 1 0.01 .
```

```
#!/usr/bin/perl -w
```

```
# Anzahl der Inputs
```

```
for ($i = 1; $i < $ARGV[0]+1; $i++) {
```

```
    # Anzeige "uber Voranschreiten der Simulation
```

```
    print "Pool $i wird bearbeitet\n";
```

```
    # Name der zu bearbeitenden Datei
```

```
    $TheFile = "pool$j";
```

```
    # Oeffnen der entsprechenden pool-Datei zum Zeilenzählen
```

```
    open(IN1, $TheFile) or die "Konnte die angegebene Datei nicht oeffnen\n";
```

```
    $linecount = 0;
```

```
    while(<IN1>) {
```

```
        $linecount++;
```

```
    }
```

```
    close(IN1);
```

```
    # Oeffnen der entsprechenden pool-Datei
```

```
    open(IN2, $TheFile) or die "Konnte die angegebene Datei nicht oeffnen\n";
```

```
    # Herausschreiben von 50% der Stammzellen
```

```
    for ($l = 1; $l < $linecount; $l++) {
```

```
        $Line = <IN2>;
```

```

#Zufallsgenerator
srand();
$zufall=int(rand(2));

#nach String suchen
open(OUT, '>>erg.txt') or die "Datei nicht offen\n";
if (($Line=~m/dormant/) && ($zufall == 1)) {
    substr($Line,1,7)='active';
    print OUT $Line;
}
elsif (($Line=~m/active/) && ($zufall == 1)) {
    print OUT $Line;
}
}
close(IN2);

#Name der fertigen Datei
$NewFile = "active$i";

#Umbenennen der erg.txt in die jeweilige scm.outKomb_Sim
unless(rename('erg.txt',$NewFile)) {print "Datei konnte nicht umbenannt werden\n"}

} #Ende der i-Schleife

```

A.1.3 Aufbereitung der Daten für SPSS

Um zu untersuchen, in wieweit sich das Repopulationsverhalten von Zellen mit leicht veränderten Parametern und Zellen mit Normparametern unterscheiden, wurde der Mittelwert von je 50 Einzelsimulationen ermittelt. Dafür wurde ein bereit vorhandenes Skript benutzt. Außerdem sollte die Standardabweichung des Mittelwert der Normmaus zur Kontrolle dienen. Diese sollte mit *SPSS* ermittelt werden. Dafür müssen die Daten jeder scm-Ausgabedatei ausgelesen werden. Die Werte für einen Meßpunkt stehen in einer Zeile, aber in SPSS müssen sie in Spalten stehen. Hierfür wurde folgendes Perlskript entwickelt. Aufruf: `perl spss.pl <Anzahl Eingabedateien>`. Nachdem eine scm-Datei zeilenweise ausgelesen wurde, schreibt man nur jede Dreisigste in eine Hilfsdatei. Diese Datei besteht nur aus einer Spalte besteht. Dannach läßt man sie wieder aus und löscht das Zeilenende. Die ausgelesenen Daten werden durch Tabs getrennt, solange in eine Zeile geschrieben, bis 13 Werte hintereinander stehen. Dann beginnt man eine neue Zeile.


```

#!/usr/bin/perl -w

# Oeffnen der Ausgabedatei und Angabe der Zeitpunkte der Messungen
open(OUT2,'>>erg.txt') or die "Datei nicht offen.\n";
print OUT2 "T1\tT2\tT3\tT4\tT5\tT6\tT7\tT8\tT9\tT10\tT11\tT12\tT13\n";
close(OUT2);

# Anzahl der Inputdateien
for ($j=1; $j <= $ARGV[0] ; ++$j) {

    # Name der Datei, welche bearbeitet werden soll
    $TheFile = "scm\_ $j";

    # Dateinamen fuer Werte in SPSS-lesbarer Form
    $NewFile = "spss.dat";

    # Oeffnen der scm-Datei
    open(IN1, $TheFile) or die "Konnte Datei nicht lesen.\n";

    # Schreiben der Werte aus der i*30 Zeile aus scm in die Datei ergeb.txt
    for ($i=1; $i<418; ++$i) {
        $a=$i%30;
        $Line = <IN1>;
        if($a==0){
            open(OUT1,'>>ergeb.txt') or die "Datei nicht offen.\n";
            print OUT1 $Line;
            close(OUT1);
        }
    }

    # Schreiben der Anzahl der Stammzellen (active + dormant)
    #aus ergeb.txt in erg1.txt
    system "awk '{print (\$2+\$4)}' ergeb.txt >> erg1.txt";

    # Schliessen der scm-Datei
    close(IN1);

    # Loeschen der ergeb.txt
    unless(unlink('ergeb.txt') == 1){print "Datei konnte nicht geloescht werden.\n"}

} # Ende der For-Schleife fuer j ==> Anzahl der Inputdateien

# Oeffnen der Datei mit den Stammzellen
open(IN2,'erg1.txt') or die "Konnte Datei nicht lesen.\n";

```

```
# Spalten werden in Zeilen transformiert
# durch chomp wird Return-Zeichen am Ende der jeweiligen Zeile geloescht,
# die Werte werden durch Tabs getrennt in eine Zeile geschrieben
for ($c = 1; $c < 651; ++$c){

# Anzahl der Spalten
$b=$c%13;
$Line = <IN2>;
chomp($Line);
open(OUT2,'>>erg.txt') or die "Datei nicht offen.\n";
if ($b != 0) {print OUT2 "$Line\t";}
    else {print OUT2 "$Line\n";}

}# Ende der For-Schleife f"ur c

# Schliessen der jeweiligen Dateien
close(IN2);
close(OUT2);

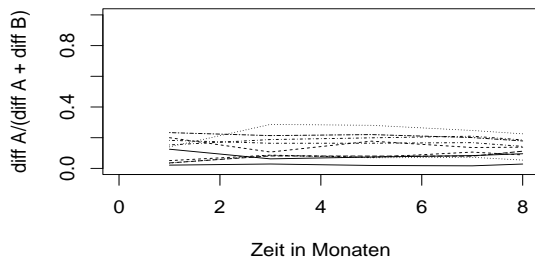
# Umbenennen der erg.txt in die jeweilige scm.outKomb_Sim
unless(rename('erg.txt',$NewFile)) {print "Datei konnte nicht umbenannt werden.\n"}
unless(unlink('erg1.txt') == 1){print "Datei konnte nicht geloescht werden.\n"}

# Ende des Programms wird angezeigt
print "\n";
print "ENDE\n";
```

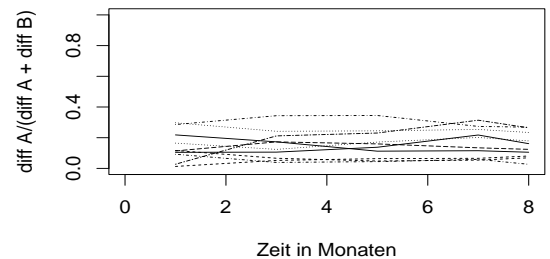
A.2 Weitere Ergebnisse

Zur Übersichtlichkeit wurden einige der Bilder in den Anhang gestellt. Die Anteile des Zelltyps A bei den differenzierten Zellen wurden gemessen (Bezeichnung: $\text{diff A}/(\text{diff A} + \text{diff B})$).

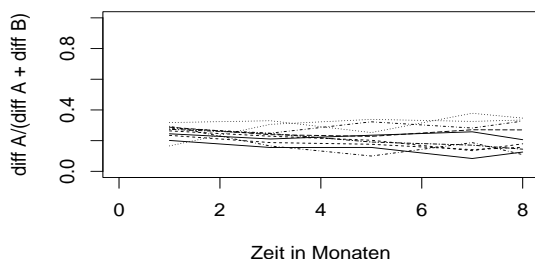
A.2.1 Teil 1



(a) Szenario A.4: Well(A) \Rightarrow 1 Zelle, Well(B) \Rightarrow 9 Zelle

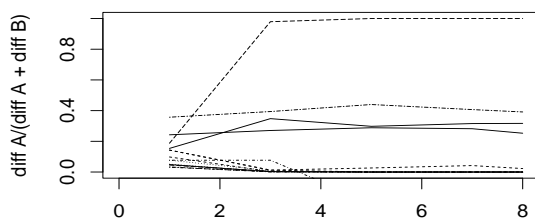


(b) Szenario A.5: Well(A) \Rightarrow 2 Zelle, Well(B) \Rightarrow 8 Zelle

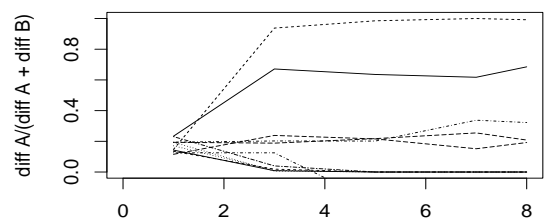


(c) Szenario A.6: Well(A) \Rightarrow 4 Zelle, Well(B) \Rightarrow 16 Zelle

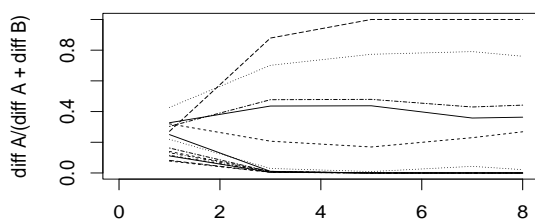
Abbildung 19: Verläufe bei unterschiedlicher Initialstammzellzahl und maximal wählbarer initialer Attachment-Affinity von 1: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten



(a) Szenario A.4: Well(A) \Rightarrow 1 Zelle, Well(B) \Rightarrow 9 Zelle



(b) Szenario B.5: Well(A) \Rightarrow 2 Zelle, Well(B) \Rightarrow 8 Zelle



(c) Szenario B.6: Well(A) \Rightarrow 4 Zelle, Well(B) \Rightarrow 16 Zelle

Abbildung 20: Verläufe bei unterschiedlicher Initialstammzellzahl und initialer Attachment-Affinity von 0.1: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

A.2.2 Teil 2

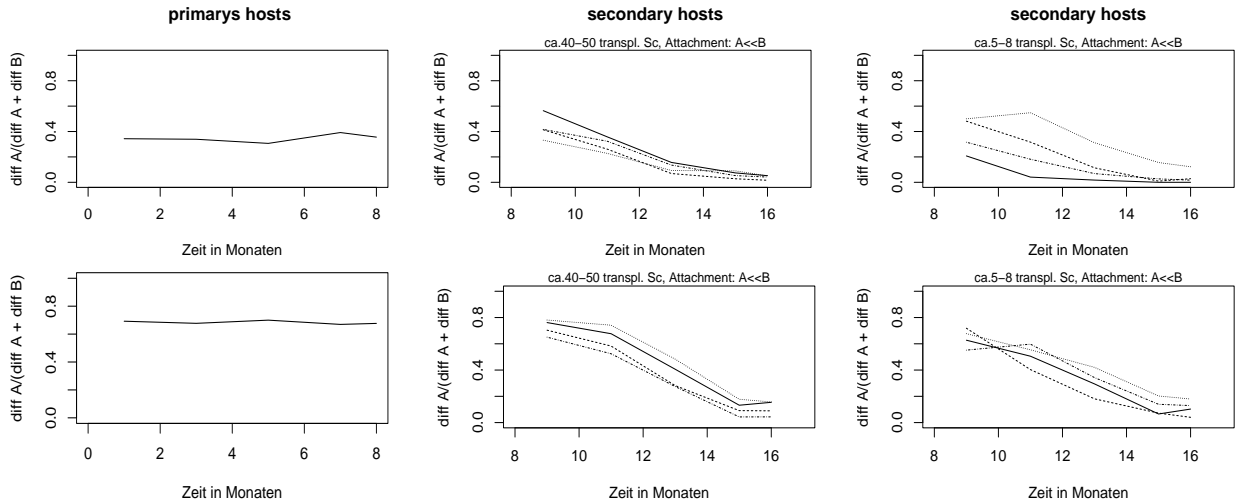


Abbildung 21: Szenario Aa2: Verläufe der Stammzellen mit der Attachmentkurven der A-Zellen unterhalb der B-Zellen(Referenzmaus): gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (=> Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

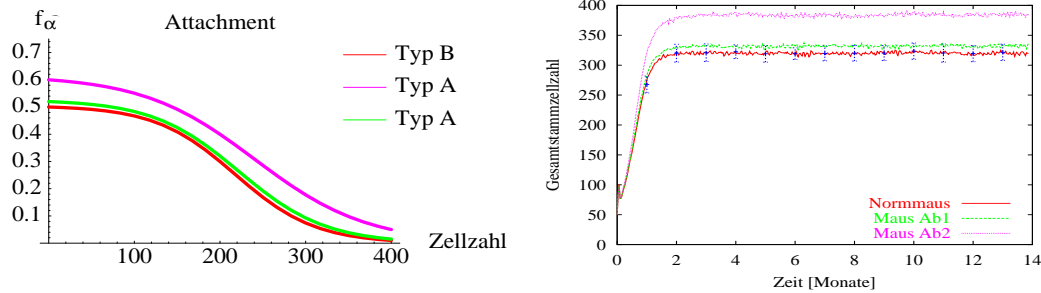


Abbildung 22: Szenario Ab1 + Ab2:(a) Lage zweier erhöhter Attachmentkurven (grün, pink) im Vergleich zu der einer Normmaus (rot) (b) Entwicklung der Stammzellpopulation für die Normmaus (rot) und zweier Mäuse mit veränderten Attachmentkurven (grün, pink).Dargestellt wurde jeweils der Mittelwert aus 50 Einzelsimulationen. Bei der Normmaus wurde zusätzlich die Standardabweichung des Mittelwerts (blaue Balken) bestimmt. Initialisiert wurde mit 50 Stammzellen.

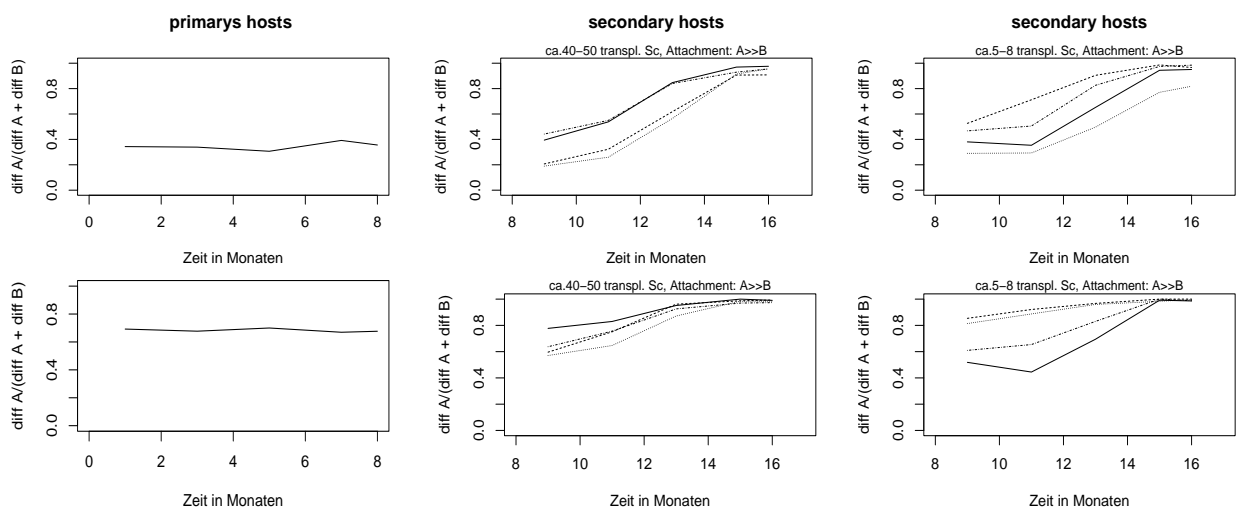


Abbildung 23: Szenario Ab2: Verläufe der Stammzellen mit der Attachmentkurven der A-Zellen oberhalb der B-Zellen(Referenzmaus): gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

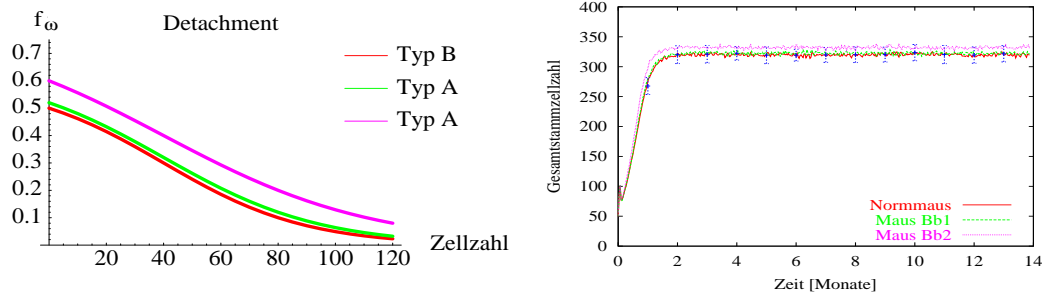


Abbildung 24: Szenario Bb1 + Bb2:(a) Lage zweier erhöhter Detachmentkurven (grün, pink) im Vergleich zu der einer Normmaus (rot) (b) Entwicklung der Stammzellpopulation für die Normmaus (rot) und zweier Mäuse mit veränderten Detachmentkurven (grün, pink). Dargestellt wurde jeweils der Mittelwert aus 50 Einzelsimulationen. Bei der Normmaus wurde zusätzlich die Standardabweichung des Mittelwerts (blaue Balken) bestimmt. Initialisiert wurde mit 50 Stammzellen

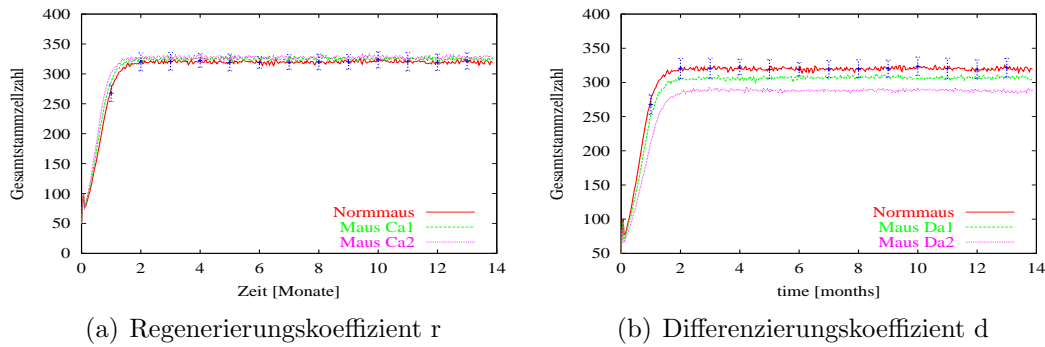


Abbildung 25: (a) Regenerierungskoeffizient r : Entwicklung der Stammzellpopulation für die Normmaus mit $r(B)=1.1$ (rot) und zweier Mäuse mit $r(A)=1.2$ (grün) bzw. $r(A)=1.4$ (pink), (b) Differenzierungskoeffizient d : Entwicklung der Stammzellpopulation für die Normmaus mit $d(B)=1.07$ (rot) und zweier Mäuse mit $d(A)=1.074$ (grün) bzw. $d(A)=1.08$ (pink). Dargestellt wurde jeweils der Mittelwert aus 50 Einzelsimulationen. Bei der Normmaus wurde zusätzlich die Standardabweichung des Mittelwerts (blaue Balken) bestimmt. Initialisiert wurde mit 50 Stammzellen

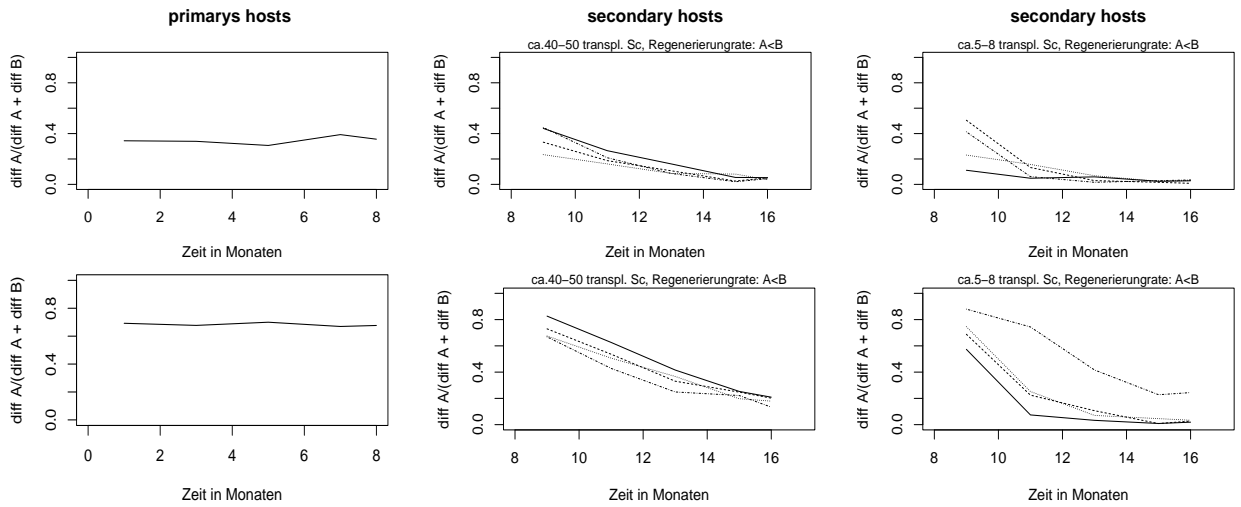


Abbildung 26: Szenario Cb2: Verläufe der Stammzellen mit dem Regenerierungskoeffizient r der A-Zellen kleiner als der B-Zellen(Referenzmaus): $r(A)=1.02$, $r(B)=1.1$: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

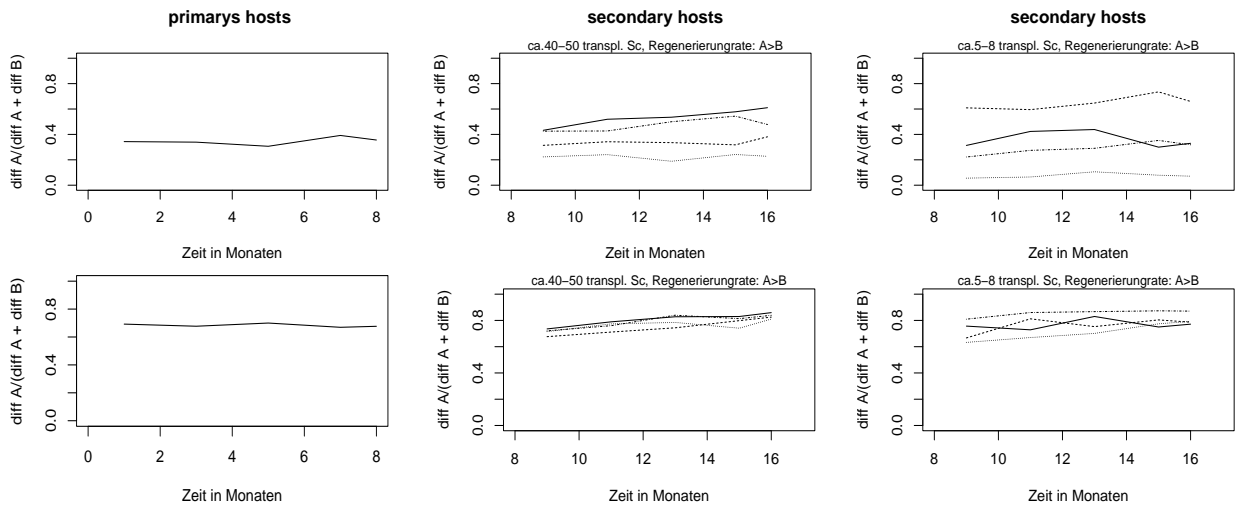


Abbildung 27: Szenario Ca1: Verläufe der Stammzellen mit dem Regenerierungskoeffizient r der A-Zellen größer als der B-Zellen(Referenzmaus): $r(A)=1.2$, $r(B)=1.1$: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

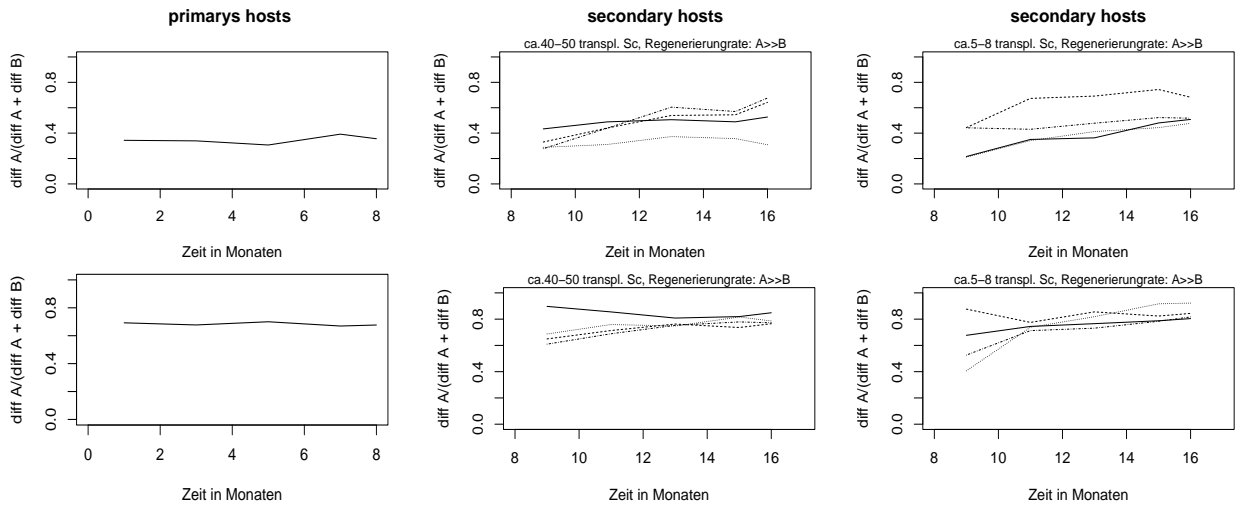


Abbildung 28: Szenario Ca2: Verläufe der Stammzellen mit dem Regenerierungskoeffizient r der A-Zellen größer als der B-Zellen(Referenzmaus): $r(A)=1.4$, $r(B)=1.1$: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

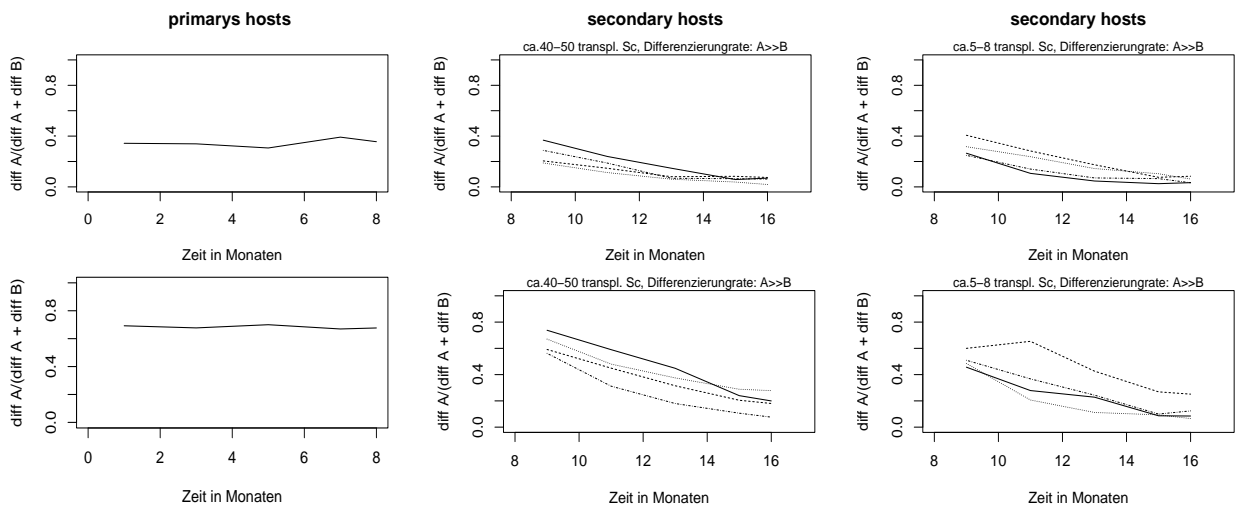


Abbildung 29: Szenario Db2: Verläufe der Stammzellen mit dem Differenzierungskoeffizient d der A-Zellen größer als der B-Zellen(Referenzmaus): $d(A)=1.08$, $d(B)=1.07$: gemessen wurde der Anteil der differenzierten Zellen des Typs A (\Rightarrow Spenderzelltyp im peripheren Blut) zu bestimmten Zeitpunkten

Literatur

- [1] Abkowitz JL, Catlin SN, Guttorp C, Guttorp P: Evidence that hematopoiesis may be a stochastic process in vivo. *Nat. Med.* 2 (2), 1996; S.190-197
- [2] Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Bagli MC, Vescovi AL: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283 (5401), Januar 1999; S.534-537
- [3] Cho RH, Müller-Sieburg CE: High frequency of long-term culture-initiating cells retain in vivo repopulation and self-renewal capacity. *Experimental Hematology* 28 (9), 2000; S.1080-1086
- [4] Down JD, Ploemacher RE: Transient and permanent engraftment potential of murine hematopoietic stem cell subsets: differential effect of host conditioning with gamma radiation and cytotoxic drugs. *Experimental Hematology* 21 (7), 1993; S.913-921
- [5] Fleischman RA: Engraftment of W/c-kit mutant mice is determined by stem cell competition, not by increased marrow 'space'. *Experimental Hematology* 24, 1994; S.209-213
- [6] Harrisson DE, Astle CM, Lerner C: Number and continuous proliferative pattern of transplanted primitive immunohematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (3), Februar 1988; S.822-826
- [7] Harrisson DE, Astle CM: Lymphoid and erythroid repopulation in B6 W-anemic mice: a new unirradiated recipient. *Experimental Hematology* 19 (5), 1991; S.374-377
- [8] Loeffler M, Roeder I: Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models - A conceptual approach. *Cells Tissues Organs* 171 (1), 2002; S.8-26
- [9] Lord BI: Biology of the haemopoietic stem cell, S.401-422 *Academic Press, Cambridge, 1997*
- [10] Müller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, Adkins B, Sieburg HB: Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 100 (4), August 2002; S.1302-1309

- [11] Ploemacher RE, van der Sluijs P, Voerman JSA, Brons HC: An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 74 (8), Dezember 1989; S.2755-2763
- [12] Roeder I, Loeffler M: A novel dynamic model of hematopoietic stem cell organization based on the concept of within-tissue plasticity. *Experimental Hematology* 30 (8), 2002; S.853-861
- [13] Strijbosch LW, Buurman WA, Does RJ, Zinken PH, Groenewegen G: Limiting dilution assays: Experimental design and statistical analysis. *Journal of Immunological Methods* 97 (1), Februar 1987; S.133-140
- [14] Schofield R: The relationship between the spleen colony-forming cell and the haematopoietic stem cell. *Blood Cells* 4 (1-2), 1978; S.7-25
- [15] Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L: A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of colony-forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 1964; S.29-36
- [16] Wineman J, Nishikawa SI, Müller-Sieburg CE: Maintenance of high levels of pluripotent hematopoietic stem cells in vitro: Effect of stromal cells and c-kit. *Blood* 81 (2), Januar 1993; S.365-372
- [17] Wineman J, Moore K, Lemischka I, Müller-Sieburg CE: Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: Rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells. *Blood* 87 (10), Mai 1996; S.4082-4090

Abbildungsverzeichnis

1	Hämatopoetische Zelltypen	8
2	Schematische Darstellung des Experimentablaufs	10
3	Zeitliche Verläufe der Repopulation in $W^{41}W^{41}$ -Mäusen [10]	12
4	Zeitliche Verläufe der zweiten Repopulation [10]	13
5	Schematische Darstellung des Modellkonzeptes	15
6	Beispiel einer Übergangskurve	19
7	Abgesenkte Attachmentkurven und die daraus resultierende Stammzellentwicklungen	30
8	Abgesenkte Detachmentkurven und die daraus resultierende Stammzellentwicklungen	31
9	Abgesenkte Regenerierungskoeffizient bzw. Differenzierungskoeffizient und die daraus resultierende Stammzellentwicklungen	32
10	Verläufe bei gleicher Initialstammzellzahl beider Zelltypen und maximal wählbarer initialer Attachment-Affinity von 1	35
11	Verläufe bei gleicher Initialstammzellzahl beider Zelltypen und initialer Attachment-Affinity von 0.1	36
12	Verläufe bei Transplantationen von 4-Wochen alten Wells mit unterschiedlichen maximalen Attachment-Affinity in eine Maus mit 5 oder 10 Stammzellen($\hat{=}$ bestrahlter $W^{41}W^{41}$ -Maus	38
13	Secondary Host wurde mit ca. 50 bzw. 5 Zellen initialisiert und mit Normparametern simuliert	40
14	Szenario Aa1: Verläufe der Stammzellen mit der Attachmentkurven der A-Zellen ein wenig unterhalb der B-Zellen (Referenzmaus)	41
15	Szenario Ab1: Verläufe der Stammzellen mit der Attachmentkurven der A-Zellen ein wenig oberhalb der B-Zellen (Referenzmaus)	42
16	Szenario Cb2: Verläufe der Stammzellen mit $r(A)=1.05$, $r(B)=1.1$	43

17	Szenario Db2: Verläufe der Stammzellen $d(A)=1.065$, $d(B)=1.07$	44
18	Verläufe der Stammzellen mit Zellen des Spenders und des stark bestrahlten sekundären Wirtstieres	45
19	Verläufe bei unterschiedlicher Initialstammzellzahl und maximal wählbarer initialer Attachment-Affinity von 1	57
20	Verläufe bei unterschiedlicher Initialstammzellzahl und initialer Attachment-Affinity von 0.1	58
21	Szenario Aa2: Verläufe der Stammzellen mit der Attachmentkurven der A-Zellen unterhalb der B-Zellen(Referenzmaus)	59
22	Erhöhte Attachmentkurven und die daraus resultierende Stammzellentwicklungen	59
23	Szenario Ab2: Verläufe der Stammzellen mit der Attachmentkurven der A-Zellen oberhalb der B-Zellen(Referenzmaus)	60
24	Erhöhte Detachmentkurven und die daraus resultierende Stammzellentwicklungen	61
25	Erhöhte Regenerierungskoeffizient bzw. Differenzierungskoeffizient und die daraus resultierende Stammzellentwicklungen	61
26	Szenario Cb2: Verläufe der Stammzellen mit $r(A)=1.02$, $r(B)=1.1$	62
27	Szenario Ca1: Verläufe der Stammzellen mit $r(A)=1.2$, $r(B)=1.1$	62
28	Szenario Ca2: Verläufe der Stammzellen mit $r(A)=1.4$, $r(B)=1.1$	63
29	Szenario Da2: Verläufe der Stammzellen mit $d(A)=1.08$, $d(B)=1.07$	63

Tabellenverzeichnis

1	relevante Parameter	18
2	Beispielwerte einer Übergangskurve	19
3	relevante Optionen in der Sequenzdatei	20
4	Parameter der Referenzmaus	24
5	Parameter der Übergangsfunktionen für Normmaus	24
6	Parameter für die Initialzahlen der aktiven Stammzellen	34
7	Parameter für die Initialzahlen der aktiven Stammzellen bei vorheriger Well- Entwicklung	37
8	Parameter für die Attachmentkurven	41
9	Parameter für die Detachmentkurven	42
10	Parameter für Regenerierungskoeffizient r und Differenzierungskoeffizient d	43

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Leipzig

28. Februar 2003

Jana Hänel