

Untersuchung des dynamischen Verhaltens roter Blutkörperchen in mikrofluidischen Systemen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Augsburg

vorgelegt von

Susanne Braunmüller



Lehrstuhl für Experimentalphysik I
Institut für Physik
Universität Augsburg
Oktober 2011

Erster Gutachter: Prof. Dr. Achim Wixforth

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Malte Peter

Tag der Einreichung: 26. Oktober 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Dezember 2011

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung.....	7
1 Einleitung.....	1
2 Grundlegendes über rote Blutkörperchen.....	5
2.1 Physiologischer Hintergrund und Motivation.....	5
2.1.1 Das kardiovaskuläre System.....	5
2.1.2 Kleine Einführung in Rheologie und Dynamik des Blutes.....	7
2.2 Biochemie und Biophysik.....	8
2.2.1 Aufbau der Zellmembran.....	9
2.2.2 Molekulare Grundlagen biophysikalischer Eigenschaften.....	12
2.3 Mechanische und dynamische Eigenschaften.....	13
2.3.1 Blutkörperchen als elastische Festkörper.....	14
2.3.2 Gleichgewichtsformen und Formänderung roter Blutkörperchen in Ruhe.....	18
2.3.3 Dynamisches Verhalten im Scherfluss.....	20
3 Mikrofluidik: Einführung in Theorie und Experiment.....	23
3.1 Physikalische Grundlagen.....	23
3.1.1 Strömungstheorie - Die Navier-Stokes-Gleichung.....	23
3.1.2 Eigenschaften der Mikrofluidik.....	26
3.2 Verwendete mikrofluidische Komponenten und Setups.....	28
3.2.1 PDMS-Mikrokanäle.....	28
3.2.2 Glaskapillaren.....	30
3.3 Datengewinnung und Analyse.....	30
4 Qualitative Studie roter Blutkörperchen anhand hochauflösender Abbildungen.....	33
4.1 Einleitung.....	33
4.2 Membranundulationen und Kopplung zwischen Zytoskelett und Plasmamembran.....	34
4.3 Mikro- und Nanostrukturen der Zellmembran.....	35
4.4 Gleichgewichtsformen roter Blutkörperchen.....	36
4.5 Zell-Adhäsion.....	40
5 Formänderung roter Blutkörperchen im Kapillarfluss.....	43
5.1 Einleitung.....	43

5.2	Experimente und Ergebnisse.....	45
5.2.1	Allgemeines zur Durchführung und Auswertung der Experimente.....	45
5.2.2	Statistisch verteiltes Auftreten der dynamischen Formen.....	47
5.2.3	Formänderung in PDMS-Kanälen mit konstantem Querschnitt.....	50
5.2.4	Experimentelles Phasendiagramm.....	56
5.3	Das Poiseuille-Flussprofil als kritischer Parameter.....	58
5.4	Diskussion.....	60
5.4.1	Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit theoretischen Modellen.....	60
5.4.2	Einfluss der hydrodynamischen Kräfte auf den Formübergang.....	62
5.4.3	Molekulare Kontrollmechanismen der Formumwandlung.....	65
5.4.4	Physiologische Einordnung der Ergebnisse.....	66
5.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	67
6	Rote Blutkörperchen in Mikrokanälen oszillierender Breite.....	69
6.1	Einleitung.....	69
6.2	Experimente und Ergebnisse.....	70
6.3	Diskussion.....	74
7	Relaxation der Fallschirmform in die bikonkave Ruheform.....	79
7.1	Einleitung.....	79
7.2	Biochemische und mikroanatomische Grundlagen.....	80
7.2.1	Regulierung des Zytoskeletts durch Protein-Phosphorylierung.....	80
7.2.2	Bedeutung des Formgedächtnisses roter Blutkörperchen.....	82
7.3	Experimente und Ergebnisse.....	83
7.4	Diskussion.....	88
7.4.1	Zweistufige Relaxation.....	88
7.4.2	Einfluss von ATP auf das Relaxationsverhalten.....	92
7.4.3	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....	95
8	Chemisch modifizierte rote Blutkörperchen im Kapillarfluss.....	99
8.1	Einleitung, Motivation und physiologischer Hintergrund.....	99
8.2	Wirkungsweise von Formalin und Diamid.....	101
8.2.1	Formalin und Diamid: physiologische Bedeutung und Reaktivität.....	101

8.2.2	Diamid: spezifische Oxidation von Cysteinen in roten Blutkörperchen	103
8.3	Theoretische Konzepte der Polymerphysik.....	106
8.3.1	Dehnung einer idealer Polymerkette	106
8.3.2	Biegesteifigkeit eines flexiblen Stäbchens.....	109
8.3.3	Abgeleitete Hypothesen	111
8.4	Experimente und Ergebnisse.....	112
8.4.1	Analytik der modifizierten Zytoskelettproteine	112
8.4.2	Starke lokale Deformation: Mikropipetten-Aspiration	114
8.4.3	Dynamisches Verhalten in Kanälen mit konstantem Querschnitt.....	117
8.4.4	Dynamische Phasendiagramme	118
8.5	Diskussion.....	123
8.5.1	Molekulare Mechanismen der Formumwandlung im Kapillarfluss.....	124
8.5.2	Mögliche physiologische Bedeutung	131
8.6	Zusammenfassung und Ausblick	133
9	Abschließende Diskussion und Ausblick	135
Anhang		141
A.1	Probenpräparation	141
A.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	142
A.3	Herstellung der PDMS Mikrokanäle.....	142
A.4	Glaspipettenherstellung und Mikropipetten-Aspirations-Setup.....	143
A.5	Vorgehensweise bei der Durchführung der Kapillar-Experimente.....	144
A.6	Gelelektrophorese	145
A.7	Umrechnung vom quadratischen auf einen runden Kanalquerschnitt.....	145
Literaturverzeichnis		147
Danksagung.....		165
Lebenslauf		167

Kurzzusammenfassung

„The peculiar shape and unusual deformability of mammalian red blood cells (RBC's) have been the subject of much scientific debate.“ Fischer et al., 1978 [1]

Der Blutkreislauf mit seinem weitverzweigten Kapillarsystem ist ein überlebenswichtiges System im menschlichen Körper. Die Fließeigenschaften des Blutes werden maßgeblich durch die Eigenschaften der roten Blutkörperchen beeinflusst. Ein möglichst genaues Verständnis des Verhaltens roter Blutkörperchen im Kapillarfluss ist daher hilfreich, um physiologische Vorgänge und auch Krankheiten zu verstehen. Rote Blutkörperchen können als sehr elastische Membranhüllen beschrieben werden, die mit einer hämoglobinhaltigen Flüssigkeit gefüllt sind. Insbesondere die Membran der Blutkörperchen, die aus einer Lipiddoppelschicht (Plasmamembran) und einem zweidimensionalen Proteinnetzwerk (Zytoskelett) besteht, bestimmt deren viskoelastische Eigenschaften. In dieser Arbeit wurden rote Blutkörperchen im Fluss durch künstliche Kapillaren untersucht und die beobachteten Phänomene anhand mechanischer sowie molekularer Modellen interpretiert.

Im Kapillarfluss formen sich rote Blutkörperchen mit zunehmender Geschwindigkeit von ihrer bikonkaven Ruheform in eine pantoffelartige Form und schließlich in eine Fallschirmform um, wodurch sich ihr Flusswiderstand verringert. Für beide Formumwandlungen wurde eine kritische Geschwindigkeit abhängig vom Kapillardurchmesser ermittelt und ein Phasendiagramm erstellt.

Um die Rolle molekularer Mechanismen für die elastischen Eigenschaften und die Formumwandlung der Blutkörperchen im Kapillarfluss weiter aufzuklären, wurden die Blutkörperchen chemisch (mit Formaldehyd und Diamid) und auch biochemisch (mit ATP) verändert. Aus der Modifikation mit ATP zeigt sich, wie das Relaxationsverhalten und damit die elastischen Eigenschaften von Blutkörperchen durch Stoffwechselprozesse angepasst und reguliert werden können. Die chemischen Modifikationen durch Formaldehyd und Diamid dienen als Modelle für Krankheiten und schädliche Umwelteinflüsse, welche die Deformierbarkeit und damit die Formumwandlung roter Blutkörperchen im Kapillarfluss beeinflussen. Für die chemische Modifikation mit Diamid wurde gezeigt, dass Blutkörperchen in der Lage sind, diese Schäden in engen Kapillaren zu kompensieren. Es konnte ein molekulares Modell vorgestellt werden, das die beschriebenen Phänomene erklärt.

Auf der Basis der hier gewonnenen Erkenntnisse lassen sich neue Ansätze für verbesserte, theoretische Modelle, für molekulare und physiologische Prozesse im Zytoskelett und mikrofluidische Systeme für diagnostische Anwendungszwecke gewinnen.

1 Einleitung

"It is becoming clear, that not all the answers to biological function can be derived from the genome." Mouritsen & Zuckermann, 2000 [2]

Physik, Biologie und Chemie beruhen auf gemeinsame Ahnen und haben für ihren Fortschritt häufig gegenseitig voneinander profitiert. Erfindungen neuer physikalischer Messmethoden haben der Biologie und der Chemie zu neuen Erkenntnissen verholfen. Umgekehrt haben viele biologische Systeme und chemische Zusammenhänge die Physik zu neuen Denkanstößen und zur Gründung interessanter Forschungsfelder inspiriert. So ist beispielsweise die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktionalität zahlreicher Proteinen und auch der DNA verschiedenen physikalischen Methoden zu verdanken. Die Röntgenkristallographie etwa lieferte wichtige Beiträge zur Strukturaufklärung. Zur Aufklärung der Funktion biologischer Strukturen sind häufig verschiedene optische Mikroskopiertechniken Methode der Wahl, wie etwa Phasenkontrast- oder Fluoreszenzmikroskopie, ebenso Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie.

Die erstaunliche Vielfalt von Lebensformen hat die extremsten Lebensräume erobert, vom arktischen Permafrost bis hin zu heißen hydrothermalen Quellen in der Tiefsee. Der Artenreichtum erstreckt sich über acht Größenordnungen unserer Längenskalen. Diese Vielfalt ist umso erstaunlicher, wenn man sich vor Augen hält, dass der Bauplan für die Entwicklung alles Lebens durch die Anordnung der Basenpaare in der DNA-Doppelhelix festgelegt ist. Betrachtet man die faszinierende Komplexität eines Lebewesens, so drängt sich die Frage auf, ob die im Erbgut gespeicherte Information allein ausreicht, um die gesamte Entwicklung eines Lebewesens zu steuern.

In der Tat ist klar geworden, dass biologische Funktionen nicht allein aus der im Genom gespeicherten Information erklärt werden können [2-5]. Zum Beispiel kann nicht aus dem Genom abgelesen werden, wie Stoffwechsel und biologische Aktivität reguliert werden oder wie Zellen auf molekularer Ebene organisiert sind. Ein Verständnis für solche Vorgänge gelingt nur in einem interdisziplinären Ansatz aus der Kenntnis biologischer Abläufe und der Betrachtung physikalischer Zusammenhänge sowie chemischer Mechanismen. In diesem Kontext hat sich die Biophysik entwickelt, die sich gewissermaßen als Brücke zwischen Lebenswissenschaften und Physik versteht. Zwei grundlegende Prinzipien spielen in der Biophysik eine zentrale Rolle [6]:

- die selbständige Organisation elegant konzipierter, molekularer Bausteine durch formabhängige, zwischenmolekulare Kräfte
- der hierarchische Aufbau von Materie aus nahezu identischen Einheiten, die spezifische Funktionen erfüllen.

Ein spannendes Teilgebiet der Biophysik beschäftigt sich mit der Funktionsweise lebender Zellen. Dabei ist es in der Physik eine ebenso beliebte wie erfolgreiche Herangehensweise, sich zunächst mit möglichst einfach aufgebauten Vertretern des Forschungsgegenstandes zu beschäftigen. Viele grundlegende Erkenntnisse zwischen molekularer Struktur und physikalischer Funktion lebender Zellen lassen sich sehr erfolgreich an roten Blutkörperchen erforschen [7-9]. Diese sind im Vergleich zu anderen Körperzellen selbst bei Wirbeltieren erstaunlich einfach aufgebaut, nämlich aus einer Membran, die eine hämoglobinhaltige Flüssigkeit umschließt. Sie enthalten keinen Zellkern oder andere Organellen. Ihre Membran ist aus drei unterschiedlichen funktionellen Schichten nach dem universellen Grundprinzip biologischer Membranen aufgebaut, die in der Physik häufig vereinfacht als geschlossene, elastische Schale bzw. Kapsel betrachtet wird [10-13]. In diese Membran sind eine Vielzahl lebensnotwendiger Enzyme und andere Proteine eingebaut, die zur Gewinnung von Energie und zur Regulation des Stoffaustausches dienen. Die mechanischen Eigenschaften der Erythrozyten sind weitgehend durch die ausgefeilte molekulare Architektur der verbundartig aufgebauten Membran bestimmt, was ihre Erforschung auch aus materialwissenschaftlicher Sicht sehr spannend macht [14], [15]. Zum besseren Verständnis ihrer mechanischen Eigenschaften werden gerne Modellsysteme herangezogen, etwa geschlossene Polymerschalen bzw. Polymerkapseln und insbesondere sogenannte Riesenvesikel (GUVs), die aus einer geschlossenen, flüssigkeitsgefüllten Lipidmembran bestehen [11], [13], [16], [17]. Weiterhin besteht eine enge Beziehung zur Physik weicher kondensierter Materie, wie Mikroemulsionen oder auch Gele [18].

Neben fundamentalen Erkenntnissen für den Zusammenhang zwischen molekularer Organisation und mechanischer Funktion lebender Zellen leistet die Forschung an roten Blutkörperchen einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung verschiedener medizinisch relevanter Fragestellungen. Als Hauptbestandteil des Blutes beeinflussen Erythrozyten mit ihren charakteristischen Eigenschaften maßgeblich die Rheologie des Blutes und damit letztlich auch die Leistungsfähigkeit des Herz-Kreislaufsystems. Besonders wichtig ist dieser Aspekt für die Mikrozirkulation in den engen Kapillargefäßen, hier findet der eigentliche Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe statt. Erst in jüngerer Zeit wurde erkannt, dass rote Blutkörperchen auch aktiv Botenstoffe auf verschiedene Reize hin in das Blut abgeben [19]. Blutkörperchen fungieren so unter anderem als Sensoren für den Sauerstoffgehalt des Blutes und tragen durch die mechanisch induzierte Freisetzung von ATP zur Regulierung des Blutdruckes bei [20-23]. Die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht ausreichend verstanden. Störungen in dem ausgeklügelten Versorgungssystem des Körpers spiegeln sich in vielen Krankheiten wieder, wie etwa Diabetes Mellitus, Hypercholesterinämie und verschiedene Formen erblicher Anämien, um nur einige wenige Beispiele zu nennen [24-27].

Für die grundlegende Erforschung biophysikalischer Zusammenhänge mit medizinisch relevanten Fragestellungen sind Methoden und Systeme aus der Mikrofluidik besonders attraktiv. Die Mikrofluidik ist ein noch junges Forschungsgebiet und beschäftigt sich mit dem Verhalten und der Handhabung kleinster Flüssigkeitsmengen in Kanälen und ähnlichen Strukturen, die nur einige Mikrometer groß sind [28]. Der Mikrofluidik wird ein großes Potential in verschiedenen technologischen Gebieten zugesprochen, wie etwa chemischer Synthese und insbesondere biochemischer und medizi-

nischer Analytik [28], [29]. Damit leistet die hier vorgestellte Arbeit nicht nur einen wichtigen Beitrag zum grundlegenden biophysikalischen Verständnis zellulärer Vorgänge, sondern auch Ideen und Konzepte für die Entwicklung neuer mikrofluidischer Analysesysteme.

Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung biophysikalischer Eigenschaften roter Blutkörperchen in mikrofluidischen Systemen. Ähnlich wie unter physiologischen Bedingungen werden dabei druckgetriebene Kapillarflüsse eingesetzt, um Blutkörperchen in dynamischen Systemen zu verformen. Die Dimensionen der verwendeten Kanalgeometrien sind vergleichbar mit denen von Kapillargefäßen in unserem Körper. Mit $4\ \mu\text{m}$ bis $18\ \mu\text{m}$ sind die verwendeten Kapillarquerschnitte dabei häufig nicht oder nur wenig größer als der typische Durchmesser von $8\ \mu\text{m}$ der Blutkörperchen selbst. Wenn sich die Blutkörperchen durch solche engen Kapillaren bewegen, zeigen sie ein komplexes, viskoelastisches Verhalten, das im Zusammenhang mit verschiedenen Umwelteinflüssen und Krankheiten empfindlich gestört sein kann. Auch unter diesem Aspekt wurden hier verschiedene Experimente durchgeführt.

Kapitel 2 bietet einen Überblick über wissenswerte Zusammenhänge zwischen den Bestandteilen des Blutes, rheologischen Eigenschaften und der Funktion des Herzkreislaufsystems im Allgemeinen. Es werden weiterhin wichtige Aspekte zum biochemischen Aufbau roter Blutkörperchen, insbesondere mit Blick auf biophysikalisch interessante Funktionen, zusammengefasst und erläutert.

Kapitel 3 fasst die wichtigsten Grundlagen zur Mikrofluidik zusammen, hinsichtlich der Physik der hier betrachteten Systeme zum einen und der verwendeten Methoden zum anderen.

Kapitel 4 beschäftigt sich mit der spannenden Mikro- und Nanostrukturierung der Oberfläche roter Blutkörperchen, die nur in hochaufgelösten Bildern deutlich zu erkennen ist. Diese spielen auch für verschiedene dynamische Eigenschaften und Verhaltensweisen eine Rolle. In diesem Kapitel werden daher anhand von verschieden präparierten Blutkörperchen, die im Elektronenmikroskop (*Scanning Electron Microscopy, SEM*) abgebildet wurden, typische Eigenschaften und Phänomene roter Blutkörperchen anschaulich dargestellt und erläutert.

In Kapitel 5 wird untersucht, wie sich Blutkörperchen im Kapillarfluss mit zunehmender Geschwindigkeit von ihrer bikonkaven Ruheform in typische dynamische Formen umwandeln, nämlich in pantoffelartige Formen und Fallschirmformen. Die Formumwandlung bzw. Änderung der Häufigkeit der verschiedenen Formen mit zunehmender Geschwindigkeit innerhalb einer Population kann mit Konzepten der statistischen Thermodynamik beschrieben werden. Für die Umwandlung von Diskozyt in die Pantoffelform und von Pantoffelform in die Fallschirmform kann damit jeweils eine kritische Geschwindigkeit definiert werden, bei der die Formumwandlung stattfindet. Ist der Durchmesser der Kapillaren größer als der Durchmesser der Blutkörperchen, so skalieren die kritischen Geschwindigkeiten näherungsweise mit dem Quadrat des Kapillarradius (entsprechend der gekrümmten Geometrie des Poiseuille-Profiles). Für kleinere Kapillardurchmesser ist die kritische Geschwindigkeit vor allem von den Wandwechselwirkungen bestimmt.

In Kapitel 6 wird das Verhalten der Blutkörperchen in komplexeren Flussgeometrien untersucht. Es werden Mikrokanäle verwendet, deren Breite sinusförmig zu- und abnimmt. Die Blutkörperchen werden darin analog zur Oszillation der Kanalgeometrie zu verschiedenen oszillierenden

Bewegungsmustern angeregt. Solange die Kräfte, die im Kapillarfluss wirken, klein sind im Vergleich zur Biegesteifigkeit und Scherelastizität der Blutkörperchen, besitzen sie eine konstante, pantoffelartige Form und oszillieren um einen mittleren Anstellwinkel. Dominieren die im Fluss wirkenden Kräfte über die elastischen Eigenschaften, so werden die Blutkörperchen stärker verformt. Sie nehmen entlang der Kanalmitte fließend eine rotationssymmetrische Fallschirmform an und ihre Form oszilliert symmetrisch um eine mittlere Länge bzw. Breite.

Kapitel 7 beschäftigt sich mit dem Relaxationsverhalten von fallschirmförmigen Blutkörperchen, die aus einer engen Kapillare plötzlich in einen breiten Kanal treten und in ihre bikonkave Ruheform relaxieren. Dabei wurde ein zweistufiges Relaxationsverhalten beobachtet. Im ersten Schritt der Relaxation ändert sich das Längen- und Breitenverhältnis der Fallschirmform und das Blutkörperchen geht in eine napfartige Form über. Im zweiten Schritt wandert die Eindellung des Blutkörperchens über die Oberfläche, es rotiert um seine Längsachse. Diese Rotationsbewegung kann auftreten, da das Zytoskelett der Blutkörperchen ein Formgedächtnis besitzt. Beide Relaxationszeiten sind korreliert und lassen sich biochemisch durch die Zugabe von ATP beeinflussen. Das beobachtete Verhalten kann mit den schereelastischen Eigenschaften des Zytoskeletts erklärt werden.

In Kapitel 8 wird das Zytoskelett der Blutkörperchen durch zwei verschiedene Chemikalien spezifisch modifiziert. Mit Formalin wird eine intramolekulare Quervernetzung von Protein-Domänen herbeigeführt und die Blutkörperchen verformen sich im Kapillarfluss besonders bei kleinen Kapillarradien weniger leicht. Mit Diamid werden intermolekulare Protein-Quervernetzungen im Zytoskelett erzeugt, die die Blutkörperchen für Kapillardurchmesser größer als der eines Blutkörperchens weniger deformierbar werden lassen. In Kapillaren mit kleinerem Durchmesser, wo starke Reibungseffekte zwischen Kapillarwand und der Membran der Blutkörperchen dominieren, verschwindet der Membran-versteifende Effekt des Diamids. Es wird ein molekulares Modell für die unterschiedlichen Auswirkungen der beiden Chemikalien auf das Verhalten der Blutkörperchen vorgestellt und seine mögliche physiologische Bedeutung diskutiert.

2 Grundlegendes über rote Blutkörperchen

„The non-nucleated red cell is unique among human cell type in that the plasma membrane, its only structural component, accounts for all of its diverse antigenic, transport, and mechanical characteristics.” Mohandas & Gallagher, 2008 [10]

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Verhalten roter Blutkörperchen im Kapillarfluss. Dafür wurden künstliche, durchsichtige Kapillaren verwendet, sodass sich der Blutfluss im Lichtmikroskop untersuchen lässt. In diesem Kapitel soll zunächst ein Überblick über die natürliche Umgebung der Blutkörperchen, das Herz-Kreislaufsystem, gegeben werden. Im Anschluss werden die wichtigsten biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften sowie physikalische Konzepte zur Beschreibung von Blutkörperchen dargestellt. Am Ende wird ein Überblick über ihr dynamisches Verhalten im Fluss gegeben.

2.1 Physiologischer Hintergrund und Motivation

Die Dimensionen der hier verwendeten künstlichen Kapillaren sind so gewählt, dass die Ergebnisse der Messungen insbesondere mit dem Kapillarsystem des menschlichen Körpers vergleichbar sind. Um dem Leser eine Vorstellung zu geben, welche Dimensionen die Blutgefäße in unserem Körper besitzen und welche typischen hydrodynamischen Effekte für den Blutfluss relevant sind, beginnt dieses Kapitel mit einem Überblick über das Herz-Kreislaufsystem.

2.1.1 Das kardiovaskuläre System

Das Herz-Kreislaufsystem erfüllt die lebenswichtige Aufgabe, Organe und Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen sowie Stoffwechselprodukte abzutransportieren. Der eigentliche Stoffaustausch findet dabei in den stark verzweigten Arteriolen und Kapillargefäßen statt. Um eine optimale Versorgung zu gewährleisten, ist kaum eine Zelle im Körper mehr als 20 μm bis 30 μm vom nächsten Kapillargefäß entfernt [30].

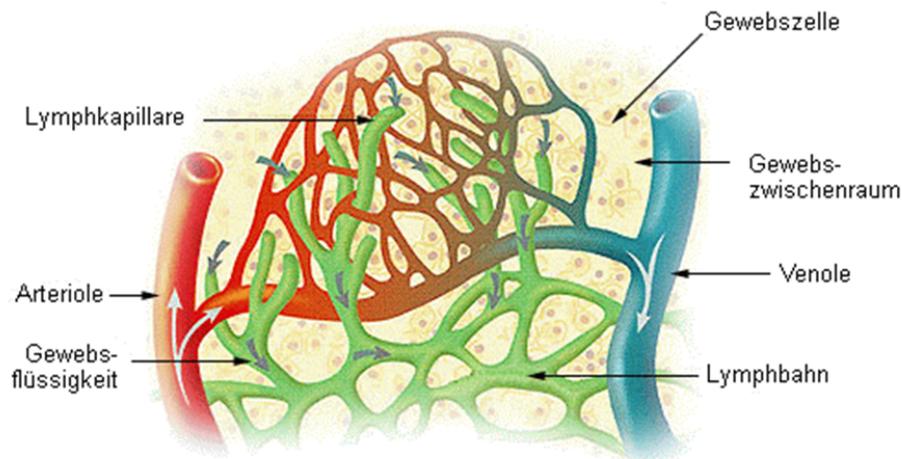


Abbildung 1: Aufbau und wichtige funktionelle Strukturen des kardiovaskulären Systems [31]. Im stark verzweigten Kapillarsystem findet der eigentliche Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe statt.

Der Gesamtquerschnitt aller Blutkapillargefäße ist um den Faktor 1000 größer als der der Aorta. Daher ist die durchschnittliche Fließgeschwindigkeit des Blutes in den Kapillaren mit 0,3 mm/s deutlich geringer als in der Aorta mit 33 cm/s. Die Kapillargefäße besitzen typischerweise nur eine Länge von 0,3 mm bis 1 mm, weshalb Blut nur 1 s bis 3 s benötigt, um diese wieder zu verlassen. Der innere Durchmesser der Arteriolen beträgt bis zu 100 μm , der von Kapillargefäßen beträgt 4 μm - 9 μm und ist somit mitunter kleiner als der typische Durchmesser eines Blutkörperchens, der 8 μm beträgt [30].

	Durchmesser (μm)	Mittlere Geschwindigkeit mm/s	Reynoldszahl $Re = \rho V_m D / \eta$	Pseudo- scherrate s^{-1}
Arteriolen	60	12	0,2	200
	15	7	0,03	470
Kapillaren	5	0,2	0,0003	40
Venolen	18	0,2	0,001	10
	72	2,4	0,05	30

Tabelle 1: Typische Parameter für die Mikrozirkulation im Muskelgewebe einer Katze [32]. Die Viskosität des Blutes ist $\eta = 3,84 \text{ mPa s}$ bei einem Hämokrit von 45%.

Der Blutfluss wird durch den Herzschlag kontrolliert, die Flussgeschwindigkeit ist daher nicht kontinuierlich sondern pulsierend. In den Kapillaren wird der Blutfluss zusätzlich durch eine aktive Änderung des Querschnitts kapillarnaher Arteriolen und Venolen reguliert (Vasomotion), indem ringförmig um die Blutgefäße liegende Muskeln kontrahieren. Daher fließt das Blut in den Kapilla-

ren pulsierend in Intervallen von wenigen Sekunden oder gar Minuten. Als Messgröße für die aktive Regelung des Blutflusses in den Kapillaren selbst dient in erster Linie der Sauerstoffgehalt des Blutes, aber auch der Gehalt anderer, für den Stoffwechsel bedeutender, Stoffe wie Glukose oder Aminosäuren. Für eine Regulierung weiter stromaufwärts werden Botenstoffe mit etwas längerer Reichweite benötigt, hierbei spielen ATP (Adenosintriphosphat) und Stickstoffmonoxid freisetzende Mechanismen eine wichtige Rolle [19], [22], [30], [33].

2.1.2 Kleine Einführung in Rheologie und Dynamik des Blutes

Die Rheologie des Blutes ist ebenso komplex wie das vaskuläre Netzwerk. Dabei beeinflussen sich die Architektur des Gefäßsystems, das makroskopische Verhalten des Blutflusses und die Eigenschaften der roten Blutkörperchen gegenseitig [34-39].

Blut ist eine Suspension verschiedener Zellen in einer Flüssigkeit, dem Blutplasma. Blutplasma ist eine wässrige Lösung verschiedener Salze und Makromoleküle mit Molekulargewichten von bis zu 500 kDa. Die wichtigsten zellulären Bestandteile sind rote Blutkörperchen (Erythrozyten), weiße Blutkörperchen (Leukozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten). Erythrozyten besitzen hierbei den größten Volumenanteil (Hämatokrit) von etwa 40% bis 45%. Konzentration und elastische Eigenschaften der Blutkörperchen bestimmen damit maßgeblich die Fließeigenschaften des Blutes, z.B. dessen Viskosität [35], [39]. Schon vor vielen Jahren wurde erkannt, dass das Verhalten von Erythrozyten bei niedrigen Scherraten dem starrer Scheiben ähnelt, während bei hohen Scherraten ihr Flussverhalten eher dem flüssiger Tröpfchen gleicht [40].

In den Blutgefäßen formen sich bei niedrigen Scherraten häufig stapelförmige, mitunter verzweigte Erythrozyten Aggregate, die an Geldrollen oder gestapelte Mentos-Bonbons erinnern (*Rouleaux*) [41], [42]. Hierbei wird einerseits die Viskosität des Blutes stark von der Anzahl und der Größe dieser *Rouleaux* beeinflusst und andererseits die *Rouleaux*größe von der vorherrschenden Scherrate. Die dynamische Viskosität des Blutes nimmt mit steigenden Scherraten ab, was als Strukturviskosität oder im englischen treffender als *Shear Thinning* bezeichnet wird [43]. *Shear Thinning*, also die Abnahme der Viskosität mit steigender Scherrate, ist ein typisches Merkmal Nicht-Newtonscher Flüssigkeiten.

Die Bildung von Aggregaten wird gefördert durch Makromoleküle bestimmter Größe, z.B. Fibrinogen und anderen Proteinen die bei entzündlichen Erkrankungen vermehrt im Blutplasma vorhanden sind [44-46]. Aggregierte Erythrozyten erhöhen im Allgemeinen die Viskosität des Blutes, ab einer gewissen Menge und Größe wird allerdings der gegenteilige Effekt festgestellt. Auch die Verteilung von weißen Blutzellen und Thrombozyten im Blutstrom wird durch die *Rouleaux* beeinflusst [32], [37], [42].

Im weit verzweigten Netzwerk der Blutgefäße sind Plasma und zelluläre Blutbestandteile unterschiedlich verteilt, abhängig von der Architektur des Gefäßsystems und der mechanischen Zelleigenschaften [36], [38], [47]. Im Blutstrom wandern die weichen, deformierbaren roten Blutkörperchen stets weg von den Wänden in Richtung Zentrum der Blutgefäße. Die Ursache ist eine

sogenannte Lift-Kraft, die bewirkt, dass sich weiche, verformbare Objekte in einem Scherfeld entlang des Geschwindigkeitsgradienten von der Wand weg bewegen [48], [49]. Daher befindet sich an den Gefäßwänden eine zellfreie Plasma-Schicht von wenigen Mikrometern Dicke. An den mikrovaskulären Verzweigungen müssen sich zelluläre und flüssige Blutkomponenten auf zwei Tochter-Gefäße aufteilen. Die Aufteilung der Komponenten ist dabei nicht gleichmäßig, denn aufgrund der zellfreien Plasmaschicht am Rand des Blutgefäßes erhält ein dünneres Tochter-Gefäß einen niedrigeren Hämatokrit und ein dickeres Tochter-Gefäß einen höheren Hämatokrit als das Mutter-Gefäß [47]. Dieses Phänomen ist auch als *Plasma skimming* oder Zweifach-Fung-Effekt bekannt [50].

Ein verwandtes dynamisches Phänomen des Kapillarflusses ist der sogenannte Farhaeus-Effekt. Lässt man Blut durch eine Kapillare in ein Auffanggefäß fließen ist der dynamische Hämatokrit in der Kapillare immer geringer als der Hämatokrit im Auffanggefäß. Grund ist auch hier die Lift-Kraft, die die Zellen von der Wand weg drückt. Als weitere Konsequenz ist die mittlere Geschwindigkeit roter Blutkörperchen im Blutfluss immer größer als die mittlere Geschwindigkeit des Blutes insgesamt [32]. Damit in Zusammenhang steht auch, dass die Viskosität von Blut in Kapillaren geringer wird mit geringerem Durchmesser der Kapillaren (gemessen in Gefäßen länger als 300 μm) abnimmt, bis bei Durchmessern von 5 μm -7 μm das Minimum erreicht ist (Fahraeus-Lindqvist Effekt) [32], [51].

2.2 Biochemie und Biophysik

Die zentrale Funktion roter Blutkörperchen ist es, Sauerstoff zum Gewebe hin und Kohlendioxid abzutransportieren [52], [53]. Erst in jüngerer Zeit wurde erkannt, dass sie zudem wichtige Aufgaben in vielen anderen Prozessen besitzen, wie etwa bei der Regulierung des Blutdrucks oder als Sensoren für pH- und Sauerstoffgehalt des Blutes [19], [22], [33]. Menschliche rote Blutkörperchen sind vergleichsweise einfach aufgebaute, zelluläre Strukturen, bestehend aus einer Zellmembran die ein flüssiges Volumen (Zytosol) umschließt. Sie besitzen weder Zellkern noch Organellen in ihrem Inneren, deshalb gelten sie in der Biologie nicht als echte Zellen. Gesunde rote Blutkörperchen in Ruhe sind flache, bikonkave Scheiben mit einem mittleren Durchmesser von 8,0 μm und einer mittleren Höhe von 2,0 μm . Mit einem mittleren Volumen von 110 Femtolitern bei einer mittleren Oberfläche von ca. 140 μm^2 sind sie im Vergleich zu einer Kugel nur zu ca. 69 % gefüllt, was ihnen eine hohe Verformbarkeit verleiht [54].

Das Zytosol enthält keine langkettigen Polymere und ist daher eine newtonsche Flüssigkeit mit einer etwa siebenmal größeren dynamischen Viskosität als Wasser. Hauptbestandteil ist Hämoglobin, sowie verschiedene Salze und Enzyme. Rote Blutkörperchen besitzen keine Organellen und damit auch keine Mitochondrien. Ihre Energie für Stoffwechselprozesse gewinnen sie durch Milchsäuregärung [30].

Tabelle 2: Einige charakteristische Daten humaner roter Blutkörperchen [6], [54]

Produktion	$2,5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$
Lebensdauer	120 Tage
Täglicher Verlust	$2,1 \cdot 10^{10}$ Zellen
Gesamtzahl im Blut	$2,5 \cdot 10^{13}$ Zellen
Zurückgelegter Weg nach 120 Tagen	400 km
Gewicht	$3 \cdot 10^{-11}$ g
Oberfläche	$140 \mu\text{m}^2$
Volumen	$110 \mu\text{m}^3 - 90 \mu\text{m}^3$

2.2.1 Aufbau der Zellmembran

Die Zellmembran roter Blutkörperchen ist nach dem universellen Grundprinzip biologischer Membranen aufgebaut [7]. Sie besteht aus drei Schichten: der Glykokalix auf der Zellaußenseite, der zentralen Lipid-Protein-Doppelschicht (im folgenden Plasmamembran genannt) und dem Zytoskelett auf der Innenseite. Eine schematische Darstellung der verschiedenen Schichten der Biomembran ist in Abbildung 2 gezeigt.

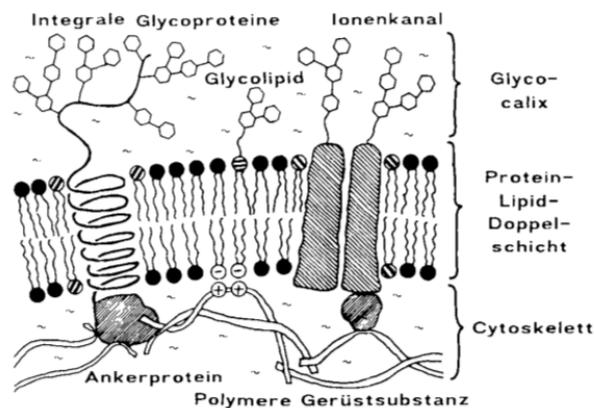


Abbildung 2. Schematischer Aufbau der Biomembran von Zellen, wie er auch für rote Blutkörperchen typisch ist [55].

Nach dem Konzept des Flüssig-Mosaik-Modells ist die Plasmamembran ein heterogenes Gemisch aus Lipiden und Proteinen, das sich wie eine zweidimensionale Flüssigkeit aus kooperativen Untereinheiten verhält [56]. Die Plasmamembran besteht aus verschiedenen gesättigten sowie ungesättigten Phospholipiden, Cholesterin-Molekülen und Proteinen, die eine fluide Lipiddoppelschicht bilden. Die zahlreichen integralen und transmembranen Proteinen erfüllen für die Zelle lebensnotwendige Funktionen, wie etwa die ATP-Synthese zur Energiegewinnung, Regulierung des

Stoffaustausches und Verankerung des Zytoskeletts. Die verschiedenen Phospholipide sind nicht gleichmäßig in den beiden Monolagen der Doppelschicht verteilt. Während sich in der äußeren Monolage vor allem ungeladene Lipide befinden, sind in der inneren hauptsächlich negativ geladene Lipide vorhanden [7], [10]. Rote Blutkörperchen enthalten Phospholipide und Cholesterin in einem nahezu äquimolaren Verhältnis [14]. Im Vergleich zu anderen Zellen ist das ein bemerkenswert hoher Anteil an Cholesterin [7]. Cholesterin spielt eine bedeutende Rolle für die Regulierung der Eigenschaften von Zellmembranen, wie etwa Permeabilität und mechanische Stabilität [25], [57].

Die Glykokalix befindet sich auf der Außenseite der Plasmamembran und ist eine dicht gepackte molekulare Schicht. Sie setzt sich aus den Kopfgruppen der Membranproteine und verschiedenen Zuckerpolymeren zusammen, die entweder kovalent an Lipide gebunden oder adsorbiert sind. Es sind zahlreiche negativ geladene Sialinsäuren in der Glykokalix enthalten. Die Moleküle der Glykokalix ragen 10 nm - 40 nm in den extrazellulären Raum hinein und dienen dem Schutz der Zelle sowie als Rezeptoren für Zellkommunikation und Stoffwechsel [7]. Die individuelle Zusammensetzung der Glykokalix bestimmt die Blutgruppe eines Menschen.

Das Zytoskelett auf der Zellinnenseite der Membran ist ein elastisches Proteinnetzwerk, das über zahlreiche Proteinanker an die Plasmamembran gekoppelt ist. Sein Aufbau ist vergleichbar mit einem lose geknüpften, hexagonalen Netzwerk, das viele Defekte und auch freie Enden besitzt [14], [15]. Die dreieckigen Einheiten des Netzes besitzen eine Seitenlänge von 70 nm bis 80 nm. Da die Proteinanker gewissermaßen in der fluiden Plasmamembran schwimmen, können sich Zytoskelett und Plasmamembran relativ zueinander verschieben. Ihre Konturen müssen allerdings einander entsprechen. Ein schematischer Aufbau des Zytoskeletts ist in Abbildung 3 dargestellt.

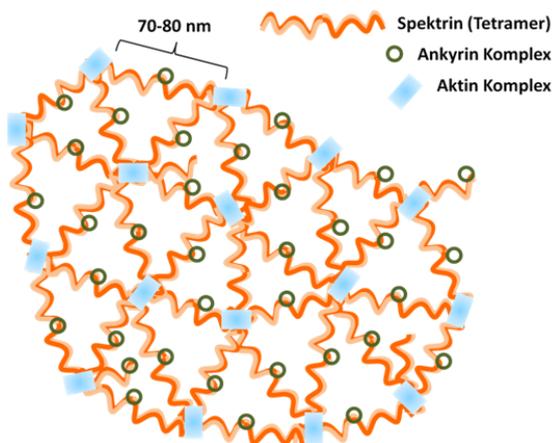


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Zytoskeletts (modifizierte Abbildung nach [8]). Spektin-Moleküle sind über Aktin zu einem zweidimensionalen, hexagonalen Netzwerk verknüpft, das zahlreiche Gitterdefekte besitzt (z.B. 5-fach, bzw. 7-fach Verknüpfungen). An den Ankyrin-Proteinkomplexen und den Aktin-Proteinkomplexen ist das Zytoskelett über weitere Proteine an der Plasmamembran befestigt. Der Abstand der Knotenpunkte beträgt im Blutkörperchen im Mittel 70 nm bis 80 nm und der Abstand zwischen Zytoskelett und Plasmamembran zwischen 30 nm und 50 nm [58], [59].

Hauptbestandteile des Zytoskeletts sind die flexiblen Spektine, die über kurze, starre Aktinfilamente zu einem hexagonalen Netzwerk verknüpft werden. Spektin ist ein Tetramer und besteht aus zwei durch Kopf-Kopf-Wechselwirkungen assoziierte Hetero-Dimere. Jedes Spektin-Dimer ist wiederum aus einer α - und einer β - Kette zusammengesetzt (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5 links). Bei physiologischem pH-Wert sind Spektinmoleküle negativ geladen. Das Spektin-

Aktin Netz ist im Wesentlichen über zwei verschiedene Arten von Multiprotein-Komplexen an die Plasmamembran gekoppelt, wie in Abbildung 3 allgemein und Abbildung 4 detaillierter dargestellt. Der eine Proteinkomplex enthält als zentralen Bestandteil Ankyrin und dockt in der Mitte des Spektrins an. Ankyrin wiederum koppelt an eine flexible, intrazelluläre Domäne des Anionentransporters Bande 3. Im zweiten Multi-Proteinkomplex wird das Zytoskelett über Aktin an die intrazelluläre Domäne des Glykoproteins Glykophorin [7] gekoppelt. Verstärkt wird diese Assoziation durch das Protein 4.1, das historisch bedingt auch als Bande 4.1 bezeichnet wird. Durch diese beiden Proteinkomplexe wird das Zytoskelett jeweils nicht-kovalent an die Plasmamembran gebunden.

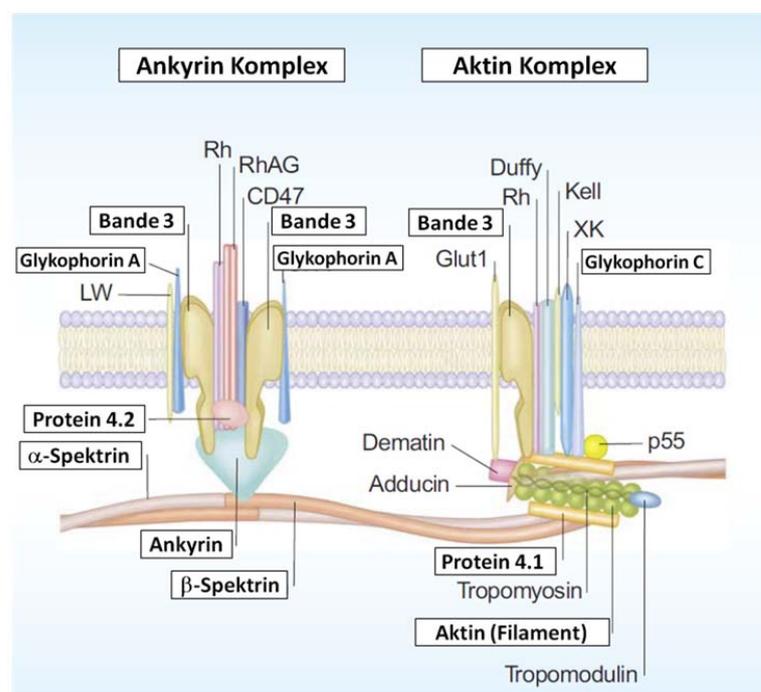


Abbildung 4: Schematische Aufbau der Protein-Komplexe, die das Zytoskelett an die Plasmamembran koppeln (modifizierte Abbildung aus [9]). Die wichtigsten Proteine sind hervorgehoben.

Erkenntnisse, die aus der Erforschung der Membran roter Blutkörperchen gewonnen werden, lassen sich auch auf andere Zellen oder zelluläre Vorgänge übertragen, denn das Spektrin-Aktin-Zytoskelett findet sich als sogenannter Kortex in fast allen Säugetierzellen. Auch die Proteine Bande 4.1 und Ankyrin sind in anderen Zellen vorhanden. Intrazelluläre Vesikel, die dem Stofftransport dienen, sind häufig mit Spektrin und Ankyrin dekoriert. In manchen Zellen finden sich statt Spektrin homologe auch Proteine, beispielsweise Fodrin in Nervenzellen oder Dystrophin in Muskelzellen [7].

Zwischen der molekularen Architektur des Zytoskeletts, den mechanischen Eigenschaften und weiteren Funktionen der Zelle besteht ein enger Zusammenhang, der im folgenden Abschnitt näher erläutert wird.

2.2.2 Molekulare Grundlagen biophysikalischer Eigenschaften

Mit ihrer unterschiedlichen molekularen Architektur bringen Plasmamembran und Zytoskelett jeweils unterschiedliche Eigenschaften mit. Ihre mechanische Robustheit beruht praktisch auf dem verbundartigen Aufbau ihrer Hülle. Das Zytoskelett besitzt ein relativ kleines Schermodul von etwa $2 \cdot 10^{-6}$ N/m bis $6 \cdot 10^{-6}$ N/m [60-62]. Es verleiht dem Blutkörperchen eine hohe Scherelastizität. Die Plasmamembran verleiht dem Blutkörperchen Biegesteifigkeit (ca. $1 \cdot 10^{-19}$ J) und Widerstand gegen Flächendehnung (ca. 450 mN/m) [63]. Als nur zu etwa 60 % gefüllte Membranhüllen kombinieren Erythrozyten so auf erstaunliche Weise Flexibilität und mechanische Stabilität.

Zur Scherelastizität des Zytoskeletts tragen verschiedene strukturelle Elemente bei, insbesondere Aufbau und Eigenschaften des Spektrins. Im gestreckten Zustand ist Spektrin 200 nm lang (Konurlänge). Durch thermisch angeregte Fluktuationen (entropische Effekte) liegt Spektrin in der Zelle teilweise geknäuelte vor und schrumpft damit auf eine effektive Länge von rund 70 nm. Es kann daher als entropische Feder beschrieben werden, die sich schon bei geringen Auslenkungen nichtlinear verhält [64-66] (vgl. Kapitel 8.3). Spektrin besitzt noch weitere elastische Strukturelemente. Die α - und β -Ketten der Heterodimere bestehen aus sich wiederholenden Anordnungen von Tripelhelices, die durch flexible Gelenke miteinander verbunden sind [59]. Bei Temperaturerhöhung (Schmelzen) oder unter Last falten sich diese, durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten Domänen schrittweise auf. Weiterhin kann das Tetramer Spektrin in der Mitte zu zwei Dimeren aufbrechen [67], [68] und so zur dynamischen Formänderung des Zytoskeletts beitragen. Solche molekularen Mechanismen führen unter Krafteinwirkung zu einer (lokalen) Aufweichung des Zytoskeletts, was im Englischen als *Networksoftening* bezeichnet wird [69-71]. Networksoftening kann auf Zeitskalen von wenigen Sekunden und Millisekunden ablaufen.

Auf deutlich längeren Zeitskalen (Minuten bis Stunden) kann die Struktur des Zytoskeletts biochemisch angepasst werden. Das Zytoskelett unterliegt ständig einer dynamischen Reorganisation, da viele (nichtkovalente) Bindungen zwischen einzelnen Proteinen ständig aufbrechen und wieder verknüpft werden [68], [72]. Dies geschieht sowohl spontan als auch gezielt, indem Bindungen durch energieverbrauchende Enzyme gebrochen oder neu verknüpft werden. Eine wichtige Rolle spielen dabei ATP-abhängige enzymatische Prozesse, die durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung die Stärke der Kopplung zwischen den Komponenten des Zytoskeletts regulieren [73-75] (vergleiche Kapitel 7). Ebenso ist die Kopplung des Zytoskeletts an die Lipiddoppelschicht nicht starr, sondern fluktuiert statistisch um eine mittlere Anzahl bestehender Bindungen [76].

Da das Zytoskelett aus flexiblen, geladenen bzw. ionisierbaren Polymeren besteht (Spektrin ist unter physiologischen Bedingungen negativ geladen), besitzt es typische Eigenschaften ionischer Gele [60], [64], [77], [78]. Ionische Gele sind sensitiv gegenüber Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke. Sie können sich als Reaktion auf eine Änderung von pH oder Ionenstärke aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen oder Lösemittelleffekte erheblich ausdehnen oder zusammenschrumpfen [64].

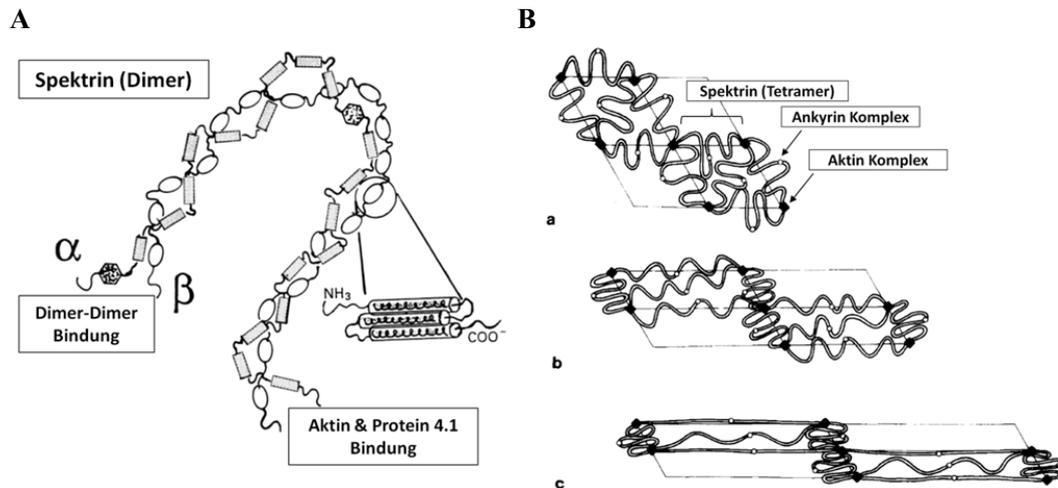


Abbildung 5 A: Schematischer Aufbau eines Spektrin Hetero-Dimers mit seinen funktionellen Domänen [8]. In einem Spektrin sind jeweils zwei Hetero-Dimere zu einem Tetramer verknüpft (hier am linken Molekülende). Die Monomere sind helikal umeinander gewunden und werden durch thermische Fluktuationen verbogen. Jedes Monomer ist aus tripelhelikalen Domänen aufgebaut (vergrößerter Ausschnitt im Bild). **B:** Schematische Darstellung zur Scherung eines Elements des Zytoskeletts mit entropisch verbogenen Spektrinmolekülen, die stärker verbogen oder gestreckt werden.

Als zweidimensionale Flüssigkeit bestimmt die Plasmamembran zum einen die Kompressibilität der Zellmembran und zum anderen deren Biegesteifigkeit. Die Fluidität (bzw. deren Kehrwert, die Viskosität) der Plasmamembran hängt stark von ihrer Zusammensetzung ab. Phospholipide mit (mehrfach) ungesättigten Kohlenwasserstoffketten erhöhen die Fluidität der Membran, gesättigte Phospholipide erniedrigen die Fluidität. Das starre Cholesterin hingegen besitzt ebenso die Tendenz die Fluidität von Phospholipidmembranen zu reduzieren, allerdings kann es in hohen Konzentrationen, wie sie natürlicherweise in Zellmembranen auftreten, die Ausbildung kristalliner Lipiddomänen verhindern und so die Viskosität wieder erniedrigen [7]. Einige Transportprozesse der Membran sowie die Aktivität von Enzymen nehmen deutlich ab, wenn die Viskosität einen bestimmten Wert übersteigt [7]. Aufgrund der Fluidität der Lipidmembran können sich die beiden Monolagen der Lipiddoppelschicht relativ zueinander verschieben, genau wie das Zytoskelett auch entlang der Lipidschicht gleiten kann. Dieser Aspekt wird auch in einem kontinuumsmechanischen Ansatz zur Erklärung verschiedener Formen und Formumwandlungen von Erythrozyten aufgegriffen, dessen Grundzüge nun zusammen mit den elastischen Eigenschaften kurz erläutert werden sollen.

2.3 Mechanische und dynamische Eigenschaften

In diesem Abschnitt werden allgemeine theoretische Grundlagen der Mechanik von Lipidmembranen vorgestellt, die auch für die Plasmamembran roter Blutkörperchen gültig sind. Es wird kurz

erläutert, wie diese mechanischen Modelle in der Vergangenheit sehr erfolgreich angewendet wurden, um verschiedene Ruheformen roter Blutkörperchen zu erklären. Schließlich wird eine Übersicht über verschiedene bekannte dynamische Phänomene roter Blutkörperchen im Scherfluss gegeben.

2.3.1 Blutkörperchen als elastische Festkörper

Lipidmembranen können als elastische Festkörper aufgefasst werden und lassen sich daher mit den Mitteln der Elastizitätstheorie beschreiben [79]. Die Lipidmembran wird dabei als eine elastische Schale aufgefasst. Schalen sind stark gekrümmte, in der Regel geschlossene Gebilde. Dabei ist die Dicke der Platte bzw. der Membran d_m , welche die Schale bildet, klein gegenüber der lateralen Dimension ihrer Fläche. Eine Deformation δu der Membran als Funktion der äußeren Kräfte lässt sich nur in wenigen Fällen analytisch lösen. Hier soll nun ein Überblick über die wichtigsten physikalischen Konzepte zur Elastizität weicher Schalen gegeben werden, die für die Eigenschaften roter Blutkörperchen von Bedeutung sind [6]. Die bikonkave Form roter Blutkörperchen folgt aus ihrer relativ große Überschussfläche¹, dem reduzierten Volumen $v = \frac{3V}{4\pi R^3} \approx 0,59$ bis 0,69. Daher verhalten sie sich ähnlich wie schwach gebogene Platten, bei welchen die Deformation δu in Normalenrichtung klein ist gegenüber ihrer Dicke d_m .

Drei Deformationsmuster bestimmen die Verformung weicher Schalen und Platten.

- isotrope Kompression (oder Dilatation)
- Scherdeformation
- Biegung

Kompression und Scherung erzeugen zueinander orthogonale Paare von Spannungen σ_1 und σ_2 , die tangential zur Fläche wirken und im zweidimensionalen die Einheit N/m besitzen (vgl. Abbildung 6a). Bei der Biegung hingegen wird eine Seite der Platte gedehnt, während die gegenüberliegende gestaucht wird. Damit wirken zwei entgegengerichtete, laterale Spannungen π_{in} und π_{out} auf die Membran (vgl. Abbildung 6b). Die damit verknüpfte elastische Energie pro Fläche wird in *Joule* oder $k_B T$ gemessen.

¹ Rote Blutkörperchen besitzen eine deutlich größere Oberfläche als eine Kugel mit selbem Volumen.

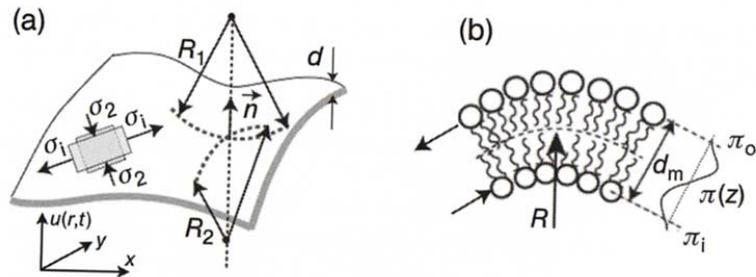


Abbildung 6: Darstellung der grundlegenden Deformationen dünner Platten (entnommen aus [6]). a) Scherung eines Membranstückes durch zwei senkrecht aufeinander stehende Spannungspaare σ_1 und σ_2 sowie Krümmung um zwei Hauptkrümmungsradien R_1 und R_2 . b) Biegedeformation einer Lipiddoppelschicht der Dicke d_m durch ein Paar entgegengerichteter tangentialer Spannungen π_1 und π_0 .

Laterale Deformation

Weiche Schalen aus makromolekularen Netzwerken, wie die roten Blutkörperchen, können lokal um mehr als 100% elastisch gedehnt werden, ohne dass sie plastisch deformiert werden. Damit kann analog zur klassischen Theorie der Gummielastizität die tangentielle Deformation durch die relativen Dehnungen $\lambda_1 = L_1/L$ und $\lambda_2 = L_2/L$ in zwei zueinander senkrechten Richtungen ausgedrückt werden. Für ein quadratisches Membranstück der Fläche $A_0 = L^2$, das in ein Rechteck der Fläche $A = \lambda_1 \lambda_2 L^2$ verformt wird, ist die relative Flächenänderung $(1 - \lambda_1 \lambda_2)$. Im Falle der reinen Scherung bleibt die Fläche erhalten, hier sind die angreifenden Spannungen σ_1 und σ_2 gleich groß, aber entgegen gerichtet und daher $\lambda_1 = \lambda_2^{-1}$.

Steht die Plasmamembran unter einer isotropen lateralen Spannung σ , so wendet man gewöhnlich die klassische Theorie der Dehnung an. Die durch die Spannung induzierte relative Flächenänderung ist

$$\frac{\delta A}{A} \approx \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{\partial u}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right)^2 \right\} = \frac{1}{2} (\text{grad } u)^2 \quad \text{Gl. 1}$$

und die mit der Dehnung verknüpfte elastische Energie ist deshalb:

$$G_{dehn} = \frac{1}{2} \sigma \{ \delta A / A \}^2 \quad \text{Gl. 2}$$

Biegedeformation fluider Schalen

Die eindimensionale Biegung einer Platte mit endlicher Dicke d erzeugt ein Paar entgegen gerichteter lateraler Spannungen π_0 und π_u an der Unterseite und der Oberseite der Platte. Daher wird die Platte auf der einen Seite gestaucht und auf der anderen gedehnt. Zwischen der gestauchten und der gedehnten Seite gibt es stets eine neutrale, nicht deformierte Ebene mit tangentialer

Spannung gleich Null. Damit ist die induzierte Verformung durch die Krümmung $H = 1/R$ um den Radius R bestimmt. Die elastische Energie ist gemäß dem Hookeschen Gesetz proportional zum Quadrat der Deformation. Damit ist die mit der Biegung verknüpfte elastische Energie pro Fläche $g_{elast} = 1/2\kappa H^2$ mit Biegemodul κ .

Die Geometrie einer beliebig gekrümmten Fläche ist bestimmt durch zwei Hauptkrümmungen R_1 und R_2 und die Energiedichte ist daher proportional zum Quadrat der mittleren Krümmung [80]:

$$H = \frac{1}{2}[(R_1^{-1}) + (R_2^{-1})] \quad \text{Gl. 3}$$

Integriert man über die Fläche, so erhält man die gesamte elastische Energie.

Biologische Membranen sind gewöhnlich asymmetrisch aufgebaut, d.h. die beiden Monolagen der Plasmamembran unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung. Daher besitzen biologische Membranen eine sogenannte *spontane Krümmung* C_0 die normalerweise isotrop ist. Damit ergibt sich für die gesamte elastische Energie der Oberfläche O folgender Zusammenhang, der auch als Helfrich-Gleichung der Biegeelastizität biologischer Membranen bekannt ist:

$$G_{curv}^{lokal} = \frac{1}{2}\kappa \iint dO \{(R_1^{-1}) + (R_2^{-1}) - C_0\}^2 \quad \text{Gl. 4}$$

Die besondere Bedeutung der spontanen Krümmung für biologische Systeme liegt darin, dass sie die elastische Energie beliebig reduzieren kann.

Die Krümmung einer Kurve entspricht der zweiten Ableitung der Auslenkung $u(x, y)$ der Platte aus der Ebene, damit kann die mittlere Krümmung ersetzt werden durch:

$$2H = \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} = \Delta u(x, y) \quad \text{Gl. 5}$$

wobei Δ der Laplace-Operator ist.

Die spontane Krümmung kann auch als ein Spannungspaar π_{in} und π_{out} betrachtet werden (vgl. Abbildung 6b). Diese erzeugen ein Drehmoment $M = (\pi_{out} - \pi_{in})d_m$ und gemäß dem Hookeschen Gesetz wird dadurch offensichtlich eine Krümmung

$$C_0 = \frac{M}{\kappa} = \frac{(\pi_{out} - \pi_{in})d_m}{\kappa} \quad \text{oder} \quad C_0 = \frac{1}{\kappa} \int z \frac{d\pi}{dz} dz \quad \text{Gl. 6}$$

erzeugt. Dabei ist die rechte Formel eine Verallgemeinerung des Gesetzes für Situationen, in denen ein Spannungsgradient in Normalenrichtung erzeugt wird.

Die Gaußsche Krümmung $G = 1/R_1 R_2$, die strenggenommen auch zur Biegeelastizität von Schalen beiträgt, kann für fluide Membranen häufig vernachlässigt werden. Der Grund hierfür ist, dass das Integral über G , und daher die Biegeenergie, nach dem Gauß-Bonnet Theorem unabhängig von der Form ist [6].

Biegedeformation mehrschaliger Biomembranen

Bei den aus zwei gekoppelten Schalen aufgebauten Membranen roter Blutkörperchen muss zusätzlich zur obigen Beschreibung der lokalen elastischen Eigenschaften der Lipiddoppelschicht (oder genauer der Plasmamembran) noch ein Beitrag zur globalen Deformation berücksichtigt werden [6]. Diese globale Krümmungselastizität berücksichtigt, dass für die bikonkave Form der Erythrozyten die äußere Monoschicht in den konkaven Bereichen gestaucht und in den konvexen Bereichen gestreckt werden muss, während für die innere Monolage das Gegenteil zutrifft. Die Monolagen können sich dabei entlang der neutralen Fläche gegeneinander verschieben. Im Gesamten ist die elastische Energie dieser globalen Deformation nun proportional zum Quadrat der Flächenänderung ΔA zwischen innerer und äußerer Monolage. Durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Monolagen kann die Membran bereits eine spontane Flächenänderung ΔA_0 aufweisen. Daher besitzt die globale Biegeenergie die Form:

$$G_{curv}^{global} = \frac{1}{2} \kappa' \frac{\pi}{4A_0 d_m^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad \text{Gl. 7}$$

Das sogenannte globale Biegemodul κ' unterscheidet sich hierbei etwas vom lokalen Modul κ . Damit ist der gesamte Beitrag zur Biegeenergie:

$$G_{curv} = G_{curv}^{local} + G_{curv}^{global} \quad \text{Gl. 8}$$

Der Beitrag G_{curv}^{global} wird auch als Flächen-Differenz-Elastizität bezeichnet.

Weiterhin ist zu beachten, dass für die Deformation geschlossener Schalen die laterale Dehnung ein Effekt zweiter Ordnung ist und nur berücksichtigt werden muss, wenn die Auslenkung δu groß im Vergleich zur Dimension L der Platte ist. In diesem Fall wird die Deformation durch ein nicht-lineares Gleichungssystem von Föppl und von Karman beschrieben [6].

2.3.2 Gleichgewichtsformen und Formänderung roter Blutkörperchen in Ruhe

Rote Blutkörperchen besitzen kein ausgedehntes dreidimensionales Zytoskelett, ihre Form wird allein durch ihr reduziertes Volumen und die Eigenschaften der Membran bestimmt. Gesunde rote Blutkörperchen besitzen in Ruhelage eine charakteristische bikonkave Form, die als Diskozyt bezeichnet wird. Daneben existieren weitere Erscheinungsformen, die auf Krankheiten, genetische Defekte oder Medikamenteneinfluss zurückgeführt werden können [14], [81]. Genau wie Phasenumwandlungen laufen die Formumwandlungen spontan ab, wenn die Zusammensetzung der Plasmamembran oder des Zytoskeletts oder auch deren Kopplung gestört wird [82].

Die beiden häufigsten Formen sind der Echinozyt (Stachelzelle, Akanthozyt) und der Stomatozyt (schüsselförmige Zelle) (siehe Abbildung 7A). Der Echinozyt besitzt eine oder mehrere beulenartige Ausstülpungen der Membran, während der Stomatozyt im Gegensatz dazu die Form einer Schüssel hat oder auch mehrere konkave Einstülpungen besitzt. Beide Formen finden sich *in vivo* bei bestimmten Krankheiten oder durch Medikamenteneinfluss und können *in vitro* auf verschiedenste Weise erzeugt werden [81], [83-86]. Albumin und Dextran induzieren beispielsweise die Bildung von Stomatozyten, Gamma-Globuline und alkalisches Medium verursachen die Bildung von Echinozyten. Agentien, die den jeweils gegenteiligen Effekt erzeugen, können sich in ihrer Wirkung aufheben. Der Diskozyt stellt dabei gewissermaßen einen Gleichgewichtszustand zwischen diesen beiden gegensätzlichen Erscheinungen dar.

Gleichgewichtsformen durch Minimierung der elastischen Energie

Um nun die verschiedenen Ruheformen roter Blutkörperchen zu verstehen, wurden verschiedene Modelle zur makroskopischen Beschreibung der Formen elastischer Schalen bzw. roter Blutkörperchen entwickelt. Nach dem Ansatz von Helfrich werden die verschiedenen Formen als Minimalflächen der Biegeenergie symmetrischer Schalen mit spontaner Krümmung verstanden [5]. So lassen sich viele Formen aus der Minimalisierung der lokalen Energie G_{curv}^{loc} berechnen. Ein weiteres Modell, das Flächen-Differenz-Model, bezieht zusätzlich die Flächenunterschiede zwischen den lose gekoppelten Schalen mit ein [11]. Die drei Parameter, welche die Formen minimaler Biegeenergie bestimmen, sind [6]

- die effektive spontane Krümmung \widetilde{C}_0 , welche durch die Flächendifferenz zwischen zwei Schalen ΔA_0 bestimmt ist
- das reduzierte Volumen $v = 3V/4\pi R^3$
- das Verhältnis von lokalem und globalem Biegemodul $\alpha = \kappa'/\kappa$

Aus beiden Modellen lassen sich für rote Blutkörperchen charakteristische Gleichgewichtsformen berechnen (vergleiche Abbildung 7) [5], [11], [82], [87]. Durch die systematische Untersuchung von entsprechenden Phasendiagrammen konnten durch beide Modelle wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der Ruheformen gewonnen werden [88].

Als gekoppelte Schalen können sowohl innere und äußere Lipidschicht der Plasmamembran fungieren als auch Plasmamembran und Zytoskelett. Letzteres ist entscheidend für das Auftreten nicht-symmetrischer Formen, wie etwa Echinozyten oder elliptische Formen, die bei fluiden Schalen (Riesenvesikel) nicht stabil sind. Die Bildung lokaler Ausstülpungen wird ermöglicht durch die Schersteifigkeit μ des Zytoskeletts [84]. Das Zytoskelett kann als ionisches Polymer-Gel durch verschiedenste biochemische und physikalische Reize hin expandieren oder kontrahieren, also seine Fläche verändern. Daher konnte vor allem das Flächen-Differenz-Modell in jüngerer Zeit sehr erfolgreich angewendet werden, um die Formumwandlung auch im Hinblick auf molekulare Mechanismen erklären zu können [82], [84], [86], [89].

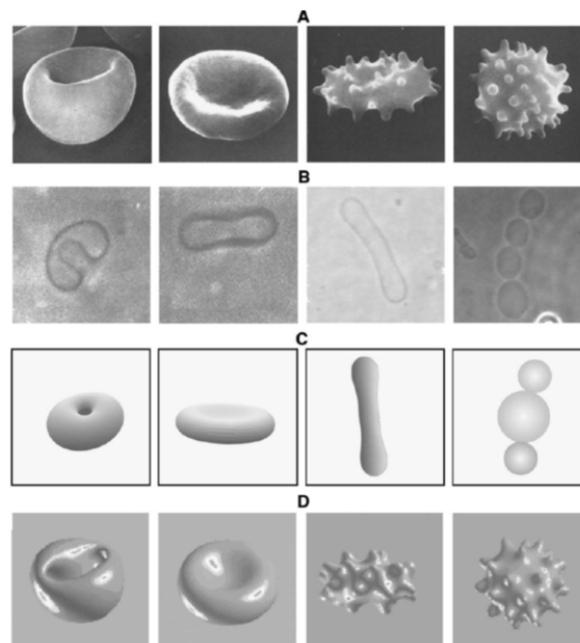


Abbildung 7: Verschiedene Ruheformen roter Blutkörperchen (A); von links nach rechts: Stomatozyt, Diskozyt, Echinozyt Typ I und Echinozyt Typ III. Im Vergleich dazu experimentelle Formen von Riesenvesikel (B) und berechnete Formen von Riesenvesikel (C) sowie berechnete Formen roter Blutkörperchen (D) [82].

Lipidvesikel als Modellobjekte

Da rote Blutkörperchen allgemein als weiche, deformierbare Objekte beschrieben werden können, werden sie häufig mit anderen weichen Objekten verglichen, wie etwa unilamellaren Riesenvesikeln (GUVs) oder Polymerkapseln [13], [90-92]. Riesenvesikel (im Folgenden häufig nur Vesikel oder Lipidvesikel genannt) bestehen, ähnlich wie die roten Blutkörperchen, aus einer Lipiddoppelschicht, die ein Flüssigkeitsvolumen umschließt. Vesikel sind damit ebenfalls elastische Schalen. Abhängig von elastischen Eigenschaften der Membran und dem Volumen—zu-Oberflächen-Verhältnis besitzen Vesikel z.B. Gleichgewichtsformen, die mit denen roter Blutkörperchen gut vergleichbar sind. Auch ihr dynamisches Verhalten ist in vieler Hinsicht vergleichbar. Vesikel besitzen allerdings kein Zytoskelett und deshalb keine Scherelastizität. Ihr Verhalten im

Scherfluss lässt sich leichter durch theoretische Modelle beschreiben, als das es für Blutkörperchen der Fall ist. Sie sind gerade für Theoretiker ein beliebtes und häufig verwendetes Modell. Vergleicht man das Verhalten der Vesikel mit dem von Blutkörperchen, so lassen sich insbesondere auch wichtige Rückschlüsse auf die Rolle des Zytoskeletts gewinnen.

Spannungsfreie Form und Formgedächtnis roter Blutkörperchen

Für das elastische Verhalten roter Blutkörperchen spielt es eine wichtige Rolle, ob ihre bikonkave Form spannungsfrei ist oder ob auch im Ruhezustand das Zytoskelett (lokal) gesichert ist². Wenn die bikonkave Form die spannungsfreie Form ist, kann die Architektur des Zytoskeletts nicht an allen Stellen identisch sein, da die Membran im Bereich der Dellen und am Rand unterschiedliche Krümmungen (konvexe bzw. konkave) aufweist. Mittlerweile gilt als gesichert, dass in der bikonkaven Form das native Zytoskelett spannungsfrei und daher lateral anisotrop aufgebaut ist [17], [83]. Deutlich wird diese anisotrope Struktur besonders beim dynamischen Verhalten, z. B. in linearen Scherflüssen und im Relaxationsverhalten [17], [93]. Die Bedeutung dieser Anisotropie des Zytoskeletts wird im nachfolgenden Abschnitt und Kapitel 7 noch genauer erklärt. Die lokalen Unterschiede in der Architektur führen dazu, dass rote Blutkörperchen ein Formgedächtnis besitzen. Im Zytoskelett ist die bikonkave Form exakt gespeichert, das heißt, Eindellung und Rand werden auch nach einer starken Deformation immer an derselben Stelle der Membran gebildet [94]. Die im Zytoskelett „gespeicherte“ bikonkave Form kann temporär in eine andere Form überführt werden (z.B. im Scherfluss [17], [94]). Der Aufbau des Zytoskeletts ist dem sogenannter Formgedächtnis-Polymere und Gele [95] ähnlich, mit formstabilisierenden Knotenpunkten und dazwischenliegenden Domänen, die einen Phasentübergang durchlaufen können.

2.3.3 Dynamisches Verhalten im Scherfluss

Abhängig von der Geometrie des Scherfeldes und der Flussgeschwindigkeit zeigen rote Blutkörperchen unterschiedliche dynamische Verhaltensweisen und Verformungen. Das dynamische Verhalten lässt sich grob in drei Bereiche untergliedern. Während sie sich im langsamen (linearen) Scherfluss, ähnlich wie starre Scheiben, taumelnd um die eigene Achse fortbewegen, nehmen sie mit zunehmender Geschwindigkeit eine ellipsoide Form mit festem Anstellwinkel an. Die Membran beginnt wie die Kette eines Panzers um das Zytosol zu wandern, was daher im Englischen als Panzerkettenbewegung bzw. *tank-treading* bezeichnet wird [1], [13], [96], [97]. Zwischen Taumeln und Panzerkettenbewegung findet sich ein Bereich, in dem die Blutkörperchen eine schwingende oder pendelnde Bewegung ausführen. Sie oszillieren um einen mittleren Anstellwinkel, was im Englischen als *swinging*, *vacillating-breathing* oder *trembling* bezeichnet wird. Bei diesen Deformationen im Scherfluss geht die Rotationssymmetrie des Blutkörperchens (mit Achse

² Letzteres wäre der Fall, wenn die eigentliche spannungsfreie Form des Zytoskeletts beispielsweise eine Kugel wäre und es aufgrund des reduzierten Volumens in eine andere Form gezwungen würde.

senkrecht zur Eindellung) verloren, die Spiegelebenen bleiben gewöhnlich erhalten. Die Scherrate, bei der die taumelnde Bewegung in die Panzerkettenbewegung übergeht, hängt sowohl vom Verhältnis der inneren zur äußeren Viskosität, als auch von den elastischen Eigenschaften der Membran ab. Die oszillierenden Bewegungsmuster sind auf die Anisotropie des Zytoskeletts zurückzuführen. Da es in der bikonkaven Form spannungsfrei ist, kann es in der konkaven Eindellung und konvexen Regionen (Rand) nicht identisch verknüpft sein. Es unterscheidet sich lokal in Art und Anzahl der Gitterdefekte (5- bzw. 7-Verknüpfungen) [17], [83], [86]. Die Energie, die aufgebracht werden muss, um das Zytoskelett um die konvexe Vorder- bzw. Hinterseite zu biegen, ist daher für die konkave Region am höchsten, was sich in der sich periodisch ändernden Winkelgeschwindigkeit der Panzerkettenbewegung widerspiegelt. Erste wenn die Proteine des Zytoskeletts mechanisch aufgeschmolzen (entfaltet) sind, läuft die Panzerkettenbewegung der Blutkörperchen gleichmäßig, (mit konstanter Winkelgeschwindigkeit) ab. Wenn die Kraft nicht mehr auf die Blutkörperchen einwirkt, kehrt das Zytoskelett von seiner temporären Form wieder in die bikonkave Grundform zurück (Formgedächtniseffekt) [93], [94], [98]. Die verschiedenen Bewegungsformen im linearen Scherfluss sind in Abbildung 8 B und C schematisch veranschaulicht.

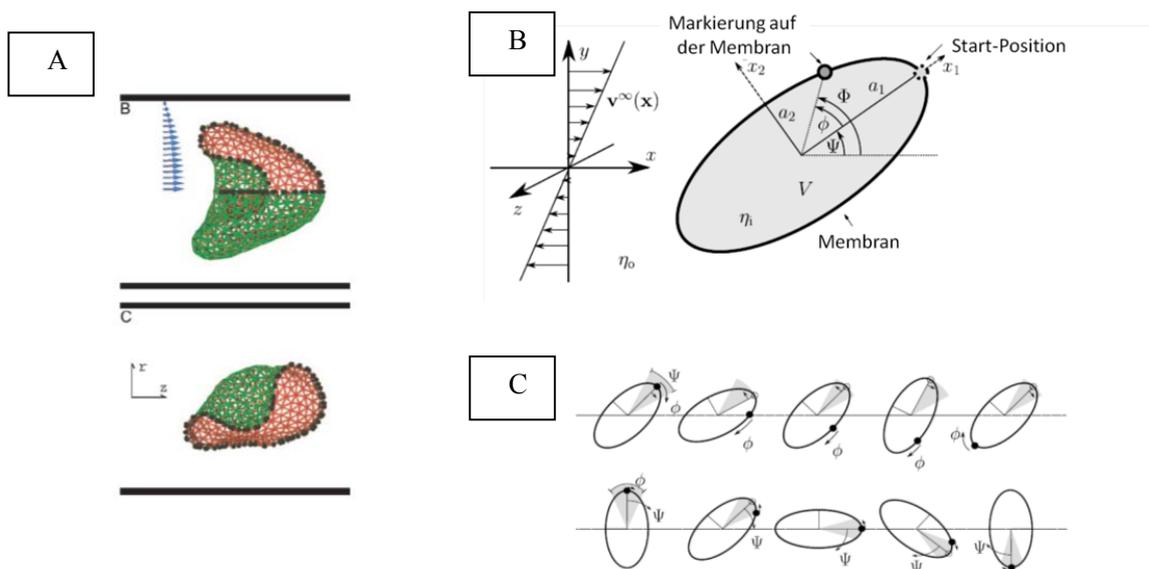


Abbildung 8: Typische Formen roter Blutkörperchen im Kapillarfluss (A). Die Fallschirmform (oben) tritt bei hoher Geschwindigkeit im Kapillarfluss auf. Sie besitzt Rotationssymmetrie mit Achse parallel zur Flussrichtung. Bei mittlerer Geschwindigkeit zeigen Blutkörperchen eine Pantoffelform (unten), die nur eine einzige Symmetrieebene besitzt [90]. B: Schematisches Modell eines Blutkörperchens im (schnellen) linearen Scherfluss mit festem Anstellwinkel. Hier rotiert die Membran in einer Panzerkettenbewegung um das Zytosol. [97] C: Taumelndes Blutkörperchen bei langsamer Flussgeschwindigkeit (unten), es rotiert wie ein Festkörper um seine eigene Achse. Im Übergang zwischen Taumeln und Panzerkettenbewegung werden pendelnde Bewegungen beobachtet, hervorgerufen durch das Formgedächtnis der roten Blutkörperchen (oben).

Auch im parabolisch gekrümmten Poiseuille-Fluss von Kapillaren lässt sich das dynamische Verhalten der Blutkörperchen grob in drei Bereiche untergliedern. Die Blutkörperchen bewegen

sich bei niedrigen Scherraten ebenso taumelnd fort und nehmen ebenso mit zunehmender Geschwindigkeit einen festen Anstellwinkel an. Anders als im linearen Scherfeld bleibt allerdings nur eine einzige Symmetrieebene erhalten, und es ist nur noch eine Eindellung zu erkennen. Diese Form erinnert an eine Pantoffel und wird daher im Englischen *Slipper* genannt (Abbildung 8 A, unten). Hier wird sie als Pantoffelform bezeichnet. Auch die Pantoffelform zeigt eine Panzerkettenbewegung der Membran. Als weitere dynamische Form werden fallschirmförmige Blutkörperchen im Kapillarfluss beobachtet (Abbildung 8 A, oben). Beide Formen, Pantoffelform und Fallschirmform, besitzen einen geringeren Flusswiderstand als diskozytische Blutkörperchen. Die Flussgeschwindigkeit, bei der Formumwandlungen in diese dynamischen Formen stattfinden, stehen in Zusammenhang mit den elastischen Eigenschaften der Membran [90], [99]. Während die symmetrische Fallschirmform Gegenstand zahlreicher theoretischer und experimenteller Arbeiten ist, sind die Einflüsse für das Auftreten unsymmetrischen Formen weniger gut untersucht und verstanden [100]. Das Auftreten dieser beiden dynamischen Formen im Kapillarfluss wird in dieser Arbeit eingehend untersucht.

3 Mikrofluidik: Einführung in Theorie und Experiment

“The manipulation of fluids in channels with dimensions of tens of micrometres – microfluidics - has emerged as a distinct new field. Microfluidics has the potential to influence subject areas from chemical synthesis and biological analysis to optics and information technology. But the field is still at an early stage of development.” Whitesides, 2006 [28]

Die Mikrofluidik beschäftigt sich mit dem Verhalten von Flüssigkeiten in mikroskopischen Systemen. Sie ist eine relativ junge Forschungsrichtung mit großem Potential für medizinische, biologische und chemische Anwendungen [28], [101]. Die Untersuchung von Blutströmungen in künstlichen Kapillaren ist ein typisches Teilgebiet der Mikrofluidik. Hier soll ein kurzer, allgemein gehaltener Überblick über die Eigenschaften mikrofluidischer Systeme und die hier verwendeten Methoden gegeben werden. Ausführlichere Darstellungen von Theorie und Anwendungen der Mikrofluidik finden sich beispielsweise in [28], [101-103] und für Fabrikationsmethoden in [104], [105]. Für mikrofluidische Anwendungen im Zusammenhang mit Blutfluss ist [98] empfehlenswert.

3.1 Physikalische Grundlagen

Das Verhalten von Flüssigkeiten wird durch die Disziplinen der Hydrostatik und der Hydrodynamik beschrieben. Dabei unterscheidet sich das makroskopische Verhalten von Flüssigkeiten, das ganz allgemein durch kleine Viskositäten und hohe Geschwindigkeiten gekennzeichnet ist, oft sehr deutlich vom mikroskopischen Verhalten von Flüssigkeiten, das ganz allgemein durch große Viskositäten und kleine Geschwindigkeiten dominiert ist. Zur Untersuchung des Fließverhaltens von Blut und seiner einzelnen Bestandteile liefern *in vitro* Experimente wichtige Beiträge zum Verständnis physiologischer und auch pathologischer Vorgänge. Weite Teile des Blutkreislaufes können nur mit mikrofluidischen Modellen richtig erfasst und verstanden werden.

3.1.1 Strömungstheorie - Die Navier-Stokes-Gleichung

Ein Fluid ist ein Medium, das sich unter dem Einfluss von Scherspannung unbegrenzt verformt. Die Strömungstheorie beschreibt die Bewegung von Fluiden und die dabei auftretenden Kräfte,

wobei das Fluid als Kontinuum aufgefasst wird. Die Bewegung eines Fluids kann grob in zwei Arten untergliedert werden:

- Laminarer Fluss:

Es dominieren innere Reibungskräfte (aufgrund von Reibung zwischen infinitesimalen Flüssigkeitsschichten) das Verhalten des Fluids, Inertialkräfte (aufgrund von Trägheit) spielen eine untergeordnete Rolle. Die Strömung zeigt deshalb keine Zeitabhängigkeit und kann als stationär bezeichnet werden. Im laminaren Fluss ist daher der Strömungswiderstand einer Kugel mit Radius r direkt proportional zur Geschwindigkeit v und zur dynamischen Viskosität η des Fluids und damit gleich der Stokes Reibung [106]

$$F = 6\pi\eta vr \quad \text{Gl. 9}$$

- Turbulenter Fluss:

Es können Verwirbelungen auf allen Größenskalen auftreten, das Fluid zeigt scheinbar zufällige, nicht-stationäre Bewegungen. Die Inertialkräfte dominieren das Verhalten gegenüber den inneren Reibungskräften der Flüssigkeit und Fluidschichten wirbeln ineinander. Im turbulenten Fluss steigt daher der Strömungswiderstand einer Kugel an und geht über in den Newtonschen Widerstand [106]

$$F = \frac{1}{2}\rho Av^2 \quad \text{Gl. 10}$$

und ist damit direkt proportional zum Quadrat der Geschwindigkeit v^2 , zur Querschnittsfläche A und zur Dichte ρ des Fluids.

Sowohl für die laminare als auch für die turbulente Strömung wird die Bewegung eines Fluids durch die Navier-Stokes-Gleichung beschrieben. Diese leitet sich aus der Impuls- und der Energieerhaltung für ein betrachtetes Fluidelement ab. Aufgrund der Massenerhaltung muss für eine vollständige Formulierung der Navier-Stokes-Gleichung die Kontinuitätsgleichung mit einbezogen werden. Da Flüssigkeiten inkompressibel sind und ihre Dichte als konstant angesehen werden kann, vereinfachen sich die allgemeinen Gleichungen zu [107]:

$$\underbrace{\rho \frac{d\vec{v}}{dt} + \rho(\vec{v} \cdot \nabla)\vec{v}}_{\text{Trägheitsterm}} = \underbrace{\vec{f} - \nabla p + \eta\Delta\vec{v}}_{\text{viskoser Term}} \quad \text{Gl. 11}$$

$$\nabla \cdot \vec{v} = 0 \quad \text{Gl. 12}$$

mit dem Geschwindigkeitsvektor \vec{v} , den externen Volumenkräften \vec{f} , der Flüssigkeitsdichte ρ und dem Druck p . Die Navier-Stokes-Gleichung für inkompressible Flüssigkeiten beschreibt damit die Strömung Newtonscher Flüssigkeiten in drei Dimensionen. Sie stellt eine Verallgemeinerung der Newtonschen Grundgleichungen für ein Kontinuum dar. Im Gegensatz zur Mechanik fester Körper bestimmt die Navier-Stokes Gleichung nicht die Position, sondern die Geschwindigkeit einer Flüssigkeit an einem gegebenen Ort und einer gegebenen Zeit. Die Lösung des Gleichungssystems erzeugt damit ein Geschwindigkeits- oder Strömungsfeld für das gesamte Flüssigkeitsvolumen, das beschrieben werden soll. Mit der vereinfachten Kontinuitätsgleichung für inkompressible Flüssigkeiten (Gl. 12) ist das Gleichungssystem für die vier Variablen v_i und p eindeutig bestimmt.

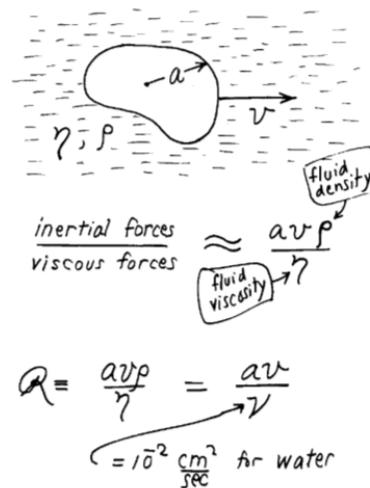


Abbildung 9: Abbildung zur Erklärung der Reynoldszahl aus der berühmten Abhandlung "Life at Low Reynolds Number" [108]

Um zu beurteilen, ob eine Strömung mit einer bestimmten Geschwindigkeit und innerhalb einer bestimmten Geometrie laminar oder turbulent ist, dient die Reynoldszahl Re . Sie beschreibt das Verhältnis von Trägheitskräften zu viskosen Kräften und ist damit ein Kriterium für das Strömungsverhalten von Fluiden [106].

$$Re = \frac{\text{Trägheitskraft}}{\text{viskose Kraft}} = \frac{\rho v^2 / L}{\eta v / L^2} = \frac{\rho v L}{\eta} = \frac{v L}{\nu} \quad \text{Gl. 13}$$

In die Reynoldszahl gehen, neben der Geschwindigkeit v der anströmenden Flüssigkeit, eine charakteristische Länge L des Systems und die kinematische Viskosität ν ein. Der Übergang von turbulenter zu laminarer Strömung wird dabei durch einen empirischen Wert der Reynoldszahl $Re_{crit} \approx 1000$ bestimmt [106]. Mit dem Kapillardurchmesser als charakteristische Länge und der

Strömungsgeschwindigkeit lässt sich also berechnen, in welchem Regime man sich befindet. Im Bereich der Kapillargefäße im Körper beispielsweise liegt Re etwa bei 0,002. Im Gegensatz dazu werden in der Aorta beispielsweise Reynoldszahlen größer 3000 erreicht und die Blutströmung ist hier auch turbulent [30].

3.1.2 Eigenschaften der Mikrofluidik

Mikrofluidische Systeme sind charakterisiert durch sehr kleine Reynoldszahlen, es herrscht laminare Strömung. Der Trägheitsterm $\rho(\vec{v} \cdot \nabla)\vec{v}$ und der Beschleunigungsterm $\rho \frac{d\vec{v}}{dt}$ der Navier-Stokes Gleichung können dadurch vernachlässigt werden. Die Strömungen sind hier folglich stationär und lassen sich durch die Stokes-Gleichungen beschreiben [107]

$$\begin{aligned} \vec{f} - \nabla p + \eta \Delta \vec{v} &= 0 \\ \nabla \cdot \vec{v} &= 0 \end{aligned} \tag{Gl. 14}$$

Das Verhalten der Flüssigkeiten bei kleinen Reynoldszahlen wird hochviskos, verglichen mit der makroskopischen Welt fühlt sich für ein Blutkörperchen die umströmende Flüssigkeit an wie zäher Honig [108]. Störungen ("Turbulenzen") in der Flüssigkeit werden schnell, über sehr kurze Distanzen gedämpft. Der Stofftransport ist bei kleinen Reynoldszahlen durch Diffusion kontrolliert und daher mitunter zu langsam für lebende Zellen. In Zellen geschieht der Stofftransport auch durch aktive, energieverbrauchende Transportsysteme, wie z.B. der Transport entlang der Mikrotubuli.

Aufgrund des großen Oberfläche/Volumen Verhältnisses in typischen mikrofluidischen Flüssigkeitsvolumina haben die Randflächen einen enormen Einfluss auf das Strömungsverhalten. Durch Adhäsion von Flüssigkeitsmolekülen an den Randschichten befindet sich hier eine ruhende Flüssigkeitsschicht. Da der Impulsübertrag zwischen Flüssigkeitsschichten nur durch innere Reibung vermittelt wird, welche Trägheitskräfte in mikrofluidischen Systemen um Größenordnungen übersteigt, bildet sich ein ausgeprägtes Scherprofil. Bei sehr kleinen Volumina, z.B. in einer Zelle, ist der Randflächeneinfluss durch das komplette Volumen spürbar. In Mikrokanälen und Kapillaren bildet sich deshalb ein parabelförmiges Scherprofil aus (Abbildung 10). Die Krümmung skaliert mit dem Radius einer runden Kapillare und beeinflusst bei konstantem Druck stark die Durchflussmenge aufgrund starker viskoser Reibungskräfte.

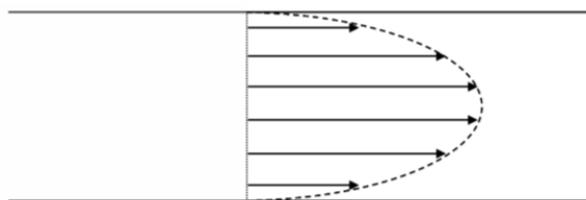


Abbildung 10: Parabelprofil der Scherströmung in einer Kapillare

Laminare Rohrströmung

Eine Flüssigkeit in einer zylindrischen Kapillare mit Radius R , welche von einer Druckkraft angetrieben wird, haftet also am Rand und strömt in der Mitte am schnellsten. An der Mantelfläche des koaxialen Flüssigkeitszylinders mit Radius r und Länge l greift die Reibungskraft $F_R = 2\pi r l \eta \frac{dv}{dr}$ an und auf seine Deckfläche wirkt die Kraft $F_P = \pi r^2 (p_1 - p_2)$. Für den stationären Fall gilt $F_P = F_R$ und daher [106]:

$$\frac{dv}{dr} = \frac{p_1 - p_2}{2\eta l} r \quad \text{Gl. 15}$$

Wieder erhält man ein parabolisches Flussprofil

$$v = v_0 - \frac{p_1 - p_2}{4\eta l} r^2 \quad \text{mit} \quad v_0 = \frac{p_1 - p_2}{4\eta l} R^2 \quad \text{Gl. 16}$$

Durch den zylindrischen Bereich zwischen r und $r + dr$ fließt der Volumenstrom $dV = 2\pi r v(r) dr$ und durch die ganze Kapillare:

$$\dot{V} = \int_0^R 2\pi r v(r) dr = \frac{\pi(p_1 - p_2)}{8\eta l} R^4 \quad \text{Gl. 17}$$

Dies ist als Gesetz von Hagen-Poiseuille oder ohmsches Gesetz für die laminare Rohrströmung bekannt. Der Strömungswiderstand ist $8\eta l / \pi R^4$, bei gleichem Druckgefälle fließt also durch eine Kapillare mit doppeltem Radius 16mal so viel Flüssigkeit. Mittelt man über das ganze Rohr, so erhält man für die Strömungsgeschwindigkeit

$$\bar{v} = \frac{\dot{V}}{\pi R^2} = \frac{1}{2} v_0 \quad \text{Gl. 18}$$

Die Gesamtdruckkraft

$$F_P = \pi r R^2 (p_1 - p_2) \quad \text{Gl. 19}$$

ist mit dem Volumenstrom \dot{V} über folgenden Zusammenhang verknüpft

$$F_P = \frac{8\eta l}{R^2} \dot{V} \quad \text{Gl. 20}$$

3.2 Verwendete mikrofluidische Komponenten und Setups

Mikrostrukturen für mikrofluidische Anwendungen lassen sich relativ einfach und kostengünstig mittels lithographischer Verfahren herstellen, wie sie in der Halbleitertechnologie oder der Mikrosystemtechnik seit langem zum Einsatz kommen. Ähnlich wie in der Halbleitertechnologie haben sich verschiedene lithographische Verfahren für Herstellung verschiedenster mikrofluidischer Bauteile bewährt z.B. zur Herstellung so genannter MEMS (*Micro-Electrical-Mechanical-Systems*), miniaturisierter Bioreaktoren oder auch biomedizinische Systeme für analytische Anwendungen (*Lab-on-a-Chip Systems*) [28], [29]. Lithographische Techniken, Photolithographie und Softlithographie, kommen auch in dieser Arbeit zum Einsatz, um identische Mikrokanäle mit komplexer Geometrie in beliebiger Stückzahl herstellen zu können. Daneben werden auch speziell angefertigte Glaskapillaren verwendet, um Kanalgeometrien runden Querschnitten zu realisieren. Im Folgenden wird die Herstellung der verwendeten Komponenten, Setups und Proben allgemein beschrieben, die exakten Protokolle und verwendete Parameter finden sich im Anhang.

3.2.1 PDMS-Mikrokanäle

Für die Fabrikation dreidimensionaler Mikrostrukturen wird zunächst mit Photolithographie eine negative Form der gewünschten Struktur hergestellt. Am häufigsten (wie auch in dieser Arbeit) wird hierfür der epoxybasierte, photosensitive Lack SU-8 (Dow-Corning) verwendet, der in verschiedenen Viskositäten erhältlich ist, womit sich Schichtdicken (Kanalhöhen) zwischen 2 μm und wenigen 100 μm realisieren lassen. Der SU-8 Lack enthält einen Polymerisationskatalysator, der photolytisch aktiviert wird. Damit ist SU-8 ein sogenannter negativer Photolack, d.h. er polymerisiert, sobald er belichtet wird. Für die Herstellung von Mikrokanälen wird der Lack dünn auf ein Substrat aufgebracht (z.B. durch Schleuderbeschichtung) und anschließend mit einer Schablone (Maske), welche die gewünschte Kanalgeometrie abbildet, belichtet.

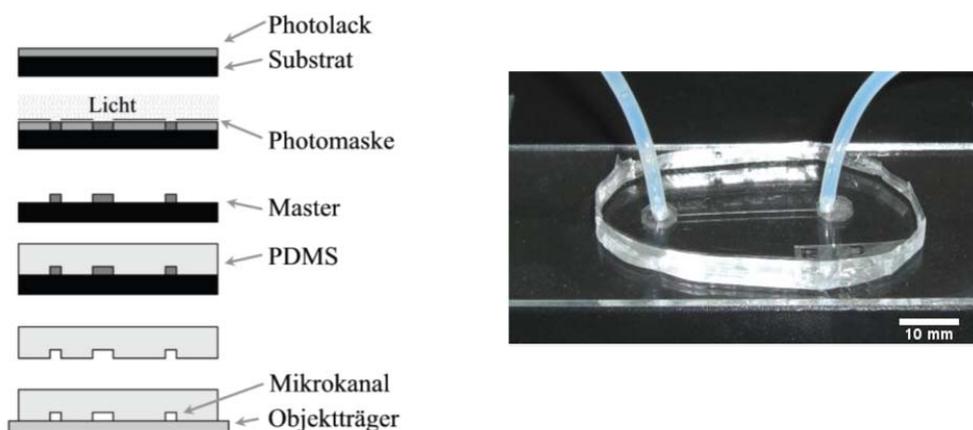


Abbildung 11.: Links: schematische Darstellung der Herstellung mikrofluidischer Komponenten mit lithographischen Methoden. Rechts: Fertiges Bauteil, ein auf Glas gebundener PDMS-Mikrokanal der mit Teflonschläuche kontaktiert ist

Die belichteten Regionen polymerisieren und härten aus. Im Anschluss werden die belichteten Stellen durch den Entwickler gelöst und entfernt. Die so hergestellte Negativ-Form (*Master*) der Mikrokanäle wird mit einem Elastomer abgegossen. Als Elastomer hat sich das Silikon Polydimethylsiloxan (PDMS) bewährt, das als Zweikomponenten System erhältlich ist und das in einem Temperaturbereich von etwa 50°C bis 200 °C ausgehärtet werden kann. PDMS besitzt eine gute thermische und chemische Beständigkeit, ist biokompatibel, ungiftig und durchsichtig, und lässt sich mit seiner gummiartigen Konsistenz auch nach der Polymerisation einfach bearbeiten. Das Material kann z.B. geschnitten oder gestanzt werden, um Löcher zu Kontaktierung von Kanälen anzubringen. PDMS kann mit sich selbst, mit Glas, Silizium, Polystyrol, Polyethylen oder Siliziumnitrid präzise, irreversibel (über kovalente Bindungen) und wasserdicht verbunden werden, indem die entsprechenden Oberflächen Sauerstoffplasma ausgesetzt und zusammengefügt werden (siehe Abbildung 11). Das durchsichtige PDMS besitzt ausgezeichnete optische Eigenschaften für die Lichtmikroskopie, die Mikrokanäle können also direkt im Lichtmikroskop verwendet werden.

Der Fluss in den Mikrokanälen wird in den Experimenten hydrostatisch getrieben. Hierfür ist der Auslass der PDMS-Mikrokanäle über einen Teflonschlauch an höhenverstellbare Flüssigkeitsreservoir angegeschlossen. Am Einlass ist ein festes Reservoir in Form einer Pipettenspitze angebracht. Die Flussgeschwindigkeit wird durch die Höhe des Auslass-Reservoirs reguliert (Abbildung 12).

Um zwei unterschiedliche Proben roter Blutkörperchen parallel zu untersuchen, wurden Mikrokanäle mit T-förmiger Geometrie verwendet, die zwei getrennte Einlässe besitzen, die zu einem gemeinsamen Auslass zusammengeführt werden. Bei gleicher Füllhöhe der Einlass-Reservoirs lassen sich somit an der Kanal-T-Kreuzung zwei verschiedene Proben unter identischen hydrostatischen Bedingungen im Mikroskop analysieren.

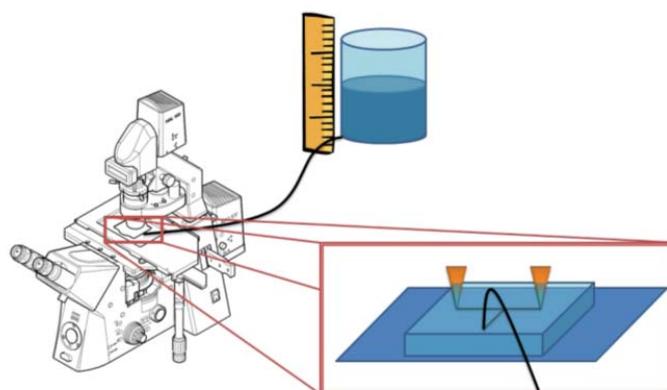


Abbildung 12: Die PDMS-Mikrokanäle werden für die Messungen in einem inversen Lichtmikroskop eingebaut. Die Strömung im Kanal wird hydrostatisch über ein höhenverstellbares Reservoir am Auslass betrieben. Im Bild ist schematisch ein T-förmiger Kanal mit zwei Einlässen und einem Auslass gezeigt [109]. Als Reservoir am Einlass dienen Plastikpipettenspitzen, die ein einfaches Befüllen mit sehr kleinen Probenvolumina erlauben.

3.2.2 Glaskapillaren

Die aus PDMS gefertigten Mikrokanäle besitzen allesamt rechteckige Querschnitte. Um rote Blutkörperchen in Kapillaren mit runden Querschnitten zu untersuchen und für die Mikropipetten-Aspirationstechnik, wurden dünne Glaskapillaren mit Durchmessern von wenigen Mikrometern hergestellt [110]. Hierfür werden Glaskapillaren in einem Mikropipettenziehgerät (Sutter Instruments, P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller) auf den gewünschten Innendurchmesser dünn ausgezogen und nach Bedarf an einer Mikroschmiede (Narishige MF-900 Microforge) nachbearbeitet. Die Glaskapillaren werden an einen Mikropipetten-Halter montiert, über den diese über einen Schlauch an ein höhenverstellbares Flüssigkeitsreservoir zur Kontrolle der Flussgeschwindigkeit angeschlossen ist. Die Pipettenspitze ragt mit ihrem dünnen Ende in eine einseitig offene Kammer, die mit der Blutkörperchenprobe befüllt ist.

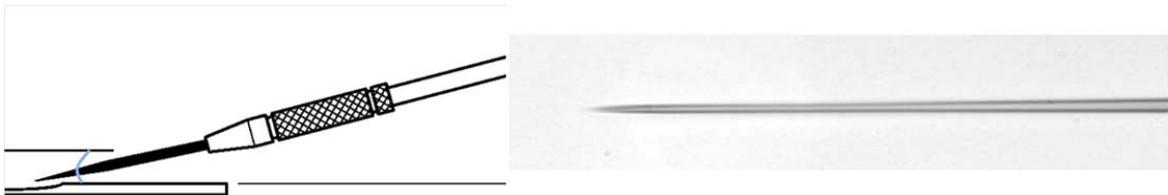


Abbildung 13: Schematische Abbildung einer Glas-Mikropipette die in eine Probenkammer eintaucht (rechts) und Abbildung einer typischen, verwendeten Glas-Mikropipette, die langsam auf einen Durchmesser von 2 μm zuläuft [110].

3.3 Datengewinnung und Analyse

Die Beobachtung der Blutkörperchen im Kapillarfluss geschieht mit optischer Mikroskopie, zur Analyse ihres dynamischen Verhaltens werden davon digitale Videoaufzeichnungen erstellt. Dank ihres roten Farbstoffes, dem Hämoglobin, lassen sich die Blutkörperchen bereits im gewöhnlichen Lichtmikroskop (Hellfeldmikroskop) gut abbilden. Aufnahmen mit mehr Kontrast liefert die Phasenkontrastmikroskopie.

Phasenkontrastmikroskopie

Bei dieser Technik werden Unterschiede im Brechungsindex von Objekten ausgenutzt, die zu einer Phasenverschiebung des am Objekt gestreuten Lichts führen. Im Hellfeld-Mikroskop ist dieses gebeugte Licht zu schwach, um durch Interferenz mit dem direkten Mikroskopierlicht ein kontrastreiches Bild zu ergeben. Für die Phasenkontrastmikroskopie wird daher im Strahlengang des Mikroskops eine sogenannte Phasenplatte (Lambda-Viertel Plättchen) eingebaut. Diese Phasenplatte muss sich etwa in der Brennebene des Objekte (erste Fourier-Ebene) befinden, sie verschiebt die Phase des direkten Lichtes um $\pi/2$. Die Phasenplatte muss gerade so groß sein, dass sie nur im Strahlengang des ungebeugten Lichtstrahls liegt. In der Praxis wird das Objekt ringförmig beleuchtet, das Lambda-Viertel Plättchen ist daher ebenfalls ringförmig und zudem

geschwächt. Es wird daher als Phasenring bezeichnet. Der Phasenring verändert also gezielt das direkte Licht durch Schwächung seiner Amplitude und Veränderung seiner Phase. Das am Objekt gebeugte Licht nimmt dagegen weitgehend unbeeinflusst an der Bildentstehung teil. Im Phasenkontrast-Mikroskop wird somit der Einfluss des gebeugten Lichts relativ zum ungebeugten Licht vergrößert. Dadurch kommt es zu einer kontrastreichen Abbildung farbloser Proben (vgl. Abbildung 14). [6] Ein Nachteil der Phasenkontrastmikroskopie ist, dass viel Licht verloren geht. Um ein Bild von einem Objekt mit ausreichender Helligkeit zu erhalten, muss die Probe mit einer deutlich höheren Lichtintensität beleuchtet werden.

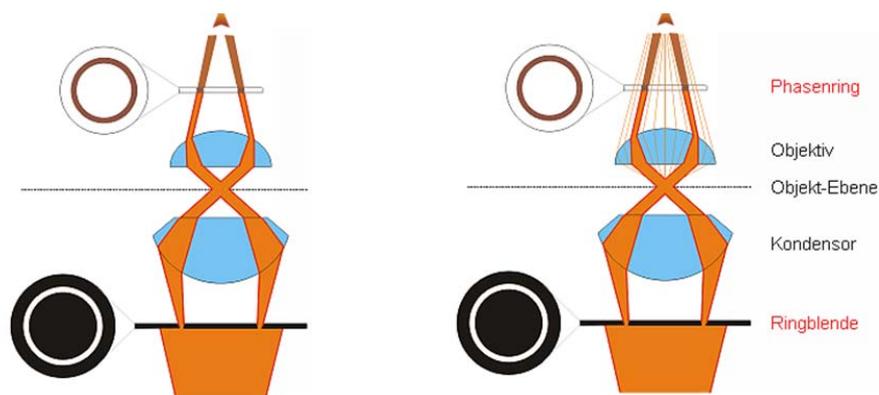


Abbildung 14: Strahlengang im Phasenkontrastmikroskop ohne (links) und mit Probe (rechts) im Strahlengang. Die Probe wird ringförmig über einen Kondensator beleuchtet. In die Brennebene der Objektivlinse ist ein dunkler Phasenring eingeschoben, welcher das direkte Licht schwächt und dessen Phase gegenüber der des gebeugten Lichts um $\pi/2$ verschiebt. Dadurch kommt es zu einer kontrastreichen Abbildung auch bei farblosen, durchsichtigen Proben [111].

Hochgeschwindigkeits-Videomikroskopie

Die Geschwindigkeiten, mit denen die Blutkörperchen sich typischerweise in Kapillaren bewegen ($v \approx 200 \mu\text{m/s}$ bis $2000 \mu\text{m/s}$), sind so hoch, dass sie von gewöhnlichen Kameras mit typischen Bildraten von 15 bis 30 Bildern pro Sekunde, nicht mehr aufgelöst werden können. Hierfür werden Hochgeschwindigkeits-Kameras benötigt, die Videos mit deutlich höheren Bildraten und entsprechend kürzeren Belichtungszeiten erstellen. Mit typischen verwendeten Bildraten größer als 5000 s^{-1} und entsprechen kleinen Belichtungszeiten von 20 ms und kürzer, werden sehr lichtintensive Bilder benötigt. Hierfür reicht die Helligkeit der Bilder in der Phasenkontrastmikroskopie, die durch die Standardbeleuchtung des verwendeten Mikroskops (Zeiss Axiovert 200M) erreicht werden kann, mitunter nicht mehr aus, um brauchbare Bildsequenzen zu erhalten. Auch aufgrund von Hitzeentwicklung bei sehr starker Beleuchtung, wurden sehr schnelle Prozesse daher mit Hellfeldmikroskopie aufgezeichnet. Die Analyse der Videos erfolgte mit der opensource Software *ImageJ* [112].

4 Qualitative Studie roter Blutkörperchen anhand hochauflösender Abbildungen

"Although atomic resolution may not be possible with biological samples, a great deal of information can still be obtained from images that provide structures at a slightly lower level of resolution." Czajkowsky, Iwamoto, Shao, 2000 [113]

4.1 Einleitung

Elektronenmikroskopische Abbildungen erlauben einen besonders anschaulichen Einblick in Form und Struktur biologischer Proben. Elektronenmikroskopische Untersuchungen lieferten bereits sehr bedeutende Beiträge zur Aufklärung der Struktur des Zytoskeletts und zur Konformation von Spektrin [59], [114]. Ebenso unerlässlich sind solche hochauflösende Aufnahmen, um die genaue Morphologie der verschiedenen Ruheformen exakt zu erfassen. Dies erleichtert einen aussagekräftigen Vergleich von verschiedenen theoretischen Modellen zur Beschreibung der morphologischen Eigenheiten roter Blutkörperchen mit tatsächlich beobachteten Formen.

Im Rasterelektronenmikroskop (*REM* bzw. *Scanning Electron Microscope, SEM*) tastet ein gebündelter Elektronenstrahl die Oberfläche der Probe zeilenweise ab, es kann eine räumliche Auflösung von Strukturen ca. 0,2 nm erreicht werden [115]. Das entspricht einer 100-fach höheren Auflösung als beim herkömmlichen Lichtmikroskop mit ca. 200 nm Auflösungsvermögen. Im SEM können nur statische, elektronisch leitfähige Proben betrachtet werden. Die Blutkörperchen werden deshalb fixiert und getrocknet, sie erscheinen daher etwas kleiner als im Lichtmikroskop (Präparation siehe Anhang). Dennoch lassen sich auch hieraus interessante und wichtige Prinzipien für die mechanischen Eigenschaften der Blutkörperchen anschaulich darstellen und erläutern. So beschreiben Wortis et al. wie sich für echinozytische Blutkörperchen die Anordnung und Form der Echinozyten-Ausbeulungen berechnen lassen, indem man nur Biege-, Dehnungs- und Scherelastizität betrachtet [84], [89]. Auch Fischer et al. beschreiben einen Zusammenhang zwischen Schermodul und Biegesteifigkeit der Membran roter Blutkörperchen und morphologischen Eigenheiten wie z.B. die Bildung von stumpfen Knicken oder Wölbungen (*buckling*) [83], [116].

In diesem Kapitel werden Mikro- und Nanostrukturen roter Blutkörperchen qualitativ untersucht und diskutiert, die besonders anschaulich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit hoher Auflösung sichtbar sind.

4.2 Membranundulationen und Kopplung zwischen Zytoskelett und Plasmamembran

Die Plasmamembran roter Blutkörperchen besitzt eine etwas größere Fläche als das Zytoskelett. Daher ist sie nicht straff über das Zytoskelett gespannt, sondern bildet eine gewellte Oberflächenstruktur von thermisch angeregten Membran-Undulationen aus [117], [118]. Die lokale Kopplung des Zytoskeletts an die Plasmamembran gibt eine Größenordnung von knapp 100 nm für die Undulationen der Plasmamembran vor, wie in Abbildung 15 deutlich zu sehen ist [86], [119]. Die Membran Undulationen sind allerdings nicht auf diese Längenskala beschränkt, durch Defekte im Zytoskelett, thermische Anregung und Änderungen in der Membran mit ihrem Alter können auch weitere Wellenlängen und entsprechenden Undulations-Frequenzen angeregt werden [120], [15].

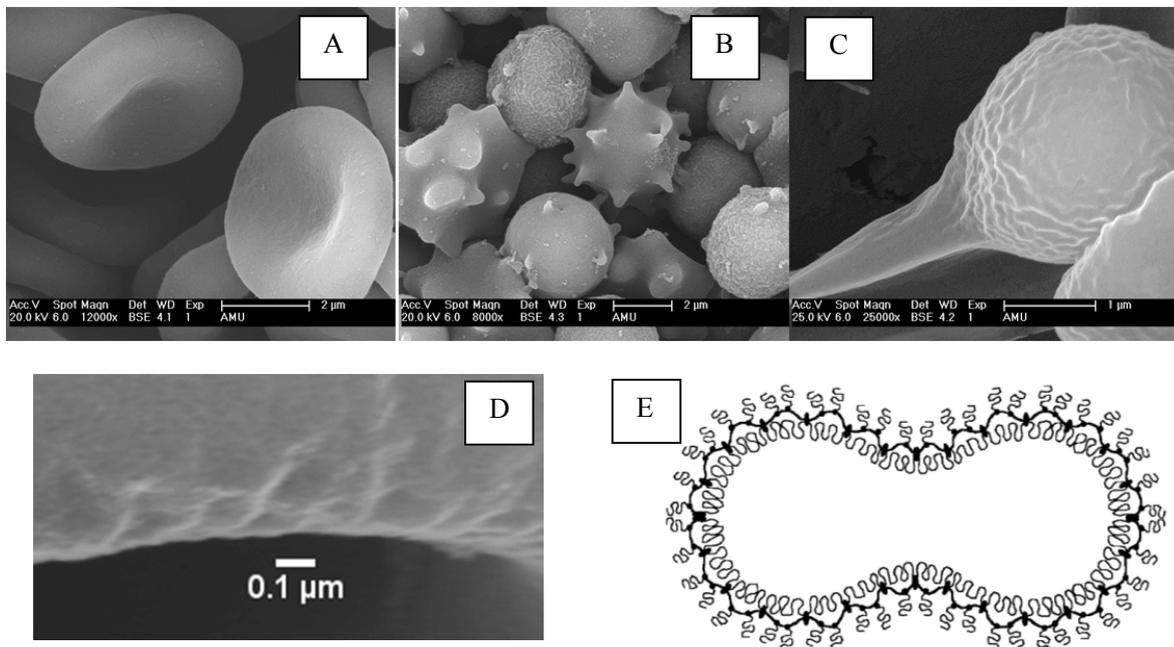


Abbildung 15: Membran-Undulationen sind als Rauigkeit auf der Plasmamembran nativer Blutkörperchen deutlich zu erkennen. A: Native bikonkave Blutkörperchen B: *In vitro* gealterte Probe mit echinozytischen Zellen mit stärkerer Oberflächenstrukturierung. Auch die Abspaltung kleiner Vesikel von der Plasmamembran ist zu erkennen. Ein Phänomen, das mit dem programmierten Zelltod (Apoptose) echter Zellen vergleichbarer ist. C: Durch *in vitro* Lagerung gealtertes Blutkörperchen mit deutlich stärkeren Undulationen. In der linken Hälfte löst sich die Plasmamembran und wird als Membranschlauch (*Tether*) vom Zytoskelett gezogen. Hier ist die Membran gespannt und nahezu frei von Undulationen. D: Zoom auf Membranundulation (BSA-behandeltes Blutkörperchen), durch die Präparation (entwässern) schrumpfen die Blutkörperchen, was den Effekt vermutlich verstärkt. E: Skizze zur Verdeutlichung von Membran-Undulationen [117]

Im Laufe ihres Lebens verlieren Blutkörperchen an freier Fläche, da die Plasmamembran kleine Lipidvesikel abspaltet, die keine Zytoskelett-Protein enthalten. Dadurch verändert sich die Oberflächenstruktur der Blutkörperchen [121], [122]. Ein ähnliches Phänomen lässt sich bei länger

gelagerten Blutkörperchen *in vitro* beobachten (Abbildung 15 B). Auch hier schnüren die Blutkörperchen kleinste Plasmamembran-Vesikel ab. Adhärirt die Plasmamembran lokal an einer Oberfläche, so bilden sich nicht nur Vesikel, sondern es können auch Membranschläuche (*Tether*) vom Zytoskelett abgezogen werden. Sind diese Membranschläuche gespannt, so ist die Plasmamembran in diesem Bereich frei von Undulationen (Abbildung 15 C).

4.3 Mikro- und Nanostrukturen der Zellmembran

Auf einer Größenordnung von wenigen Nanometern ist die Plasmamembran roter Blutkörperchen eine inhomogene Mischung verschiedener Lipide und Proteine, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu Tage tritt. Weder die Dichte der Zytoskelettproteine noch die Dichte der mobilen Plasmaproteine sind gleichmäßig über der Oberfläche der Blutkörperchen verteilt. Die Membranproteine verteilen sich vielmehr entsprechend ihrer lokalen Umgebung, wie etwa der Krümmung oder der Scherung der Membran [123]. Mobile Proteine sammeln sich dabei in stärker konvexen Regionen der Plasmamembran an [69], [124]. Beispiel hierfür sind die mobile Fraktion von Bande 3 und Glykophorin A und besonders das Rezeptorprotein CD59, welches über einen Lipidanker (Glykosylphosphatidylinositol) an die Außenseite der Plasmamembran gebunden ist [124].

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen sich auf der Plasmamembran deutlich globuläre Strukturen von wenigen 10 nm Durchmesser erkennen (Abbildung 16). Diese sind auf Multiproteinkomplexe des Zytoskeletts zurückzuführen, welche sich vor allem an den Aktin-Spektrin Knotenpunkten befinden (vgl. 2.2.1) [59], [125]. Die globulären, proteinhaltigen Strukturen sind deutlich häufiger und dichter gedrängt in den konvexen Bereichen der Plasmamembran, wie etwa am Rand oder echinozytischen Ausbeulungen, deutlich zu sehen in Abbildung 16. Im Gegensatz dazu ist das Zytoskelett zwischen echinozytischen Ausbeulungen nahezu isotrop gespannt und die hexagonale Struktur des Zytoskeletts, d.h. die Proteinkomplexe an den Knotenpunkten, treten deutlich zum Vorschein. An den Ausbeulungen ist das Zytoskelett stark geschert, sodass die globulären Strukturen in einer Richtung dichter gepackt liegen, während sich etwa senkrecht dazu die Abstände deutlich vergrößert sind. Besonders deutlich treten diese globulären Strukturen bei Echinozyten auf, die durch alkalische Bedingungen erzeugt wurden. Dies kann damit erklärt werden, dass unter alkalischen Bedingungen Bande 3 von Ankyrin dissoziiert, sodass die mobile Fraktion des Bande 3 Proteins erhöht ist [126-128].

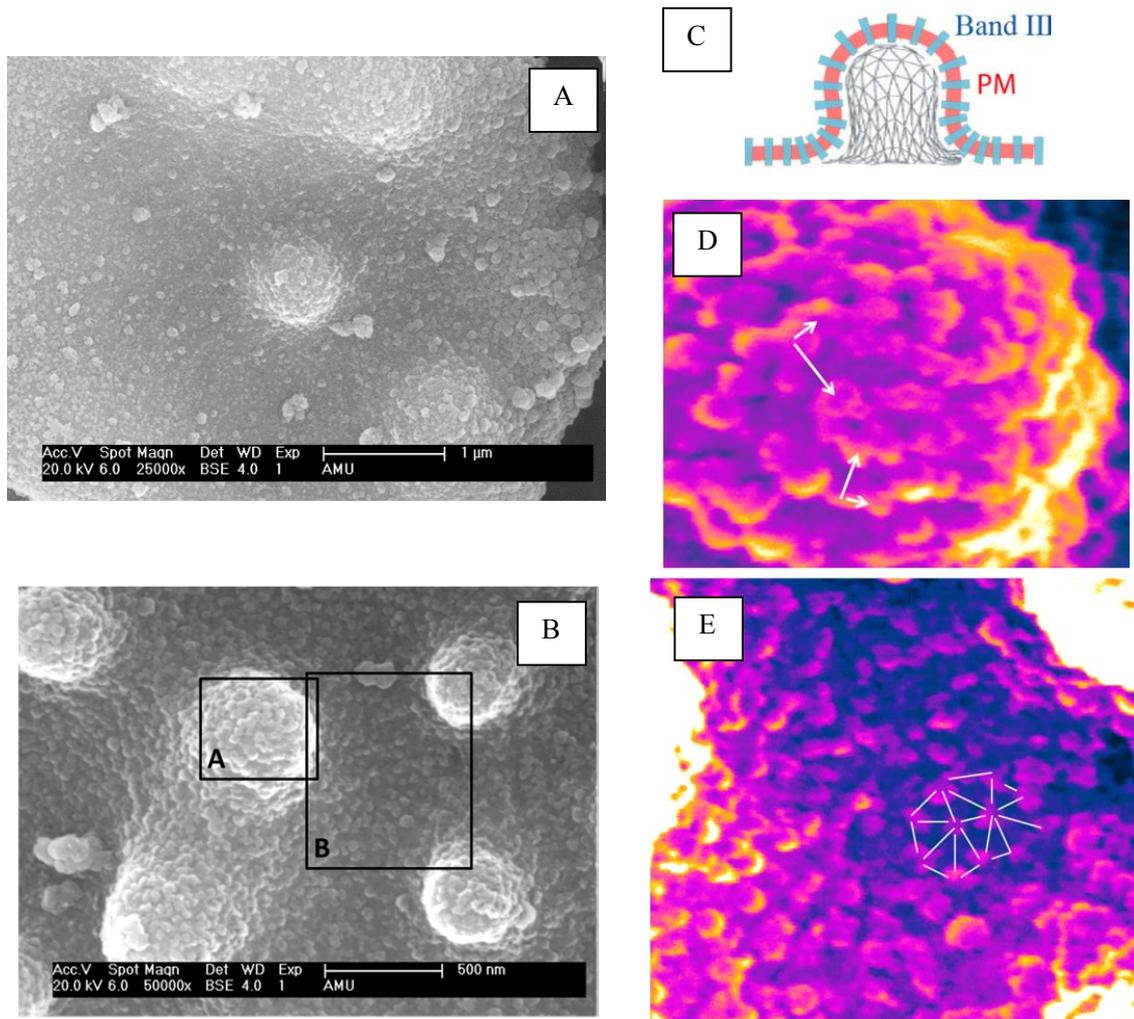


Abbildung 16: Echinozyten bei alkalischen pH-Werten (pH=10). A und B: Die globulären Strukturen sind auf Proteinagglomerate im Bereich der Spektrin-Aktin Verknüpfung des Zytoskeletts zurückzuführen [59], [125]. Diese Agglomerate sind nicht homogen auf der Oberfläche verteilt, sondern sind dichter gepackt und größer im Bereich stark konvexer Krümmung, wie etwa am Rand oder im Bereich der Ausbeulung. C: schematische Darstellung der Scherung des Zytoskeletts in einer echinozytischen Ausbeulung [15] D und E: vergrößerter Ausschnitt aus dem Bild unten links. Im konvexen Bereich sind die globulären Strukturen entlang der gedehnten und gestauchten Kanten des Zytoskeletts angeordnet. Im konkaven Bereich zwischen den Echinozyten-Beulen ist das Zytoskelett nahezu isotrop gestreckt und die hexagonalen Untereinheiten des Spektrinnetzwerkes (weiße Linien, mit Kantenlänge von etwa 50-60 nm) zeichnen sich ab.

4.4 Gleichgewichtsformen roter Blutkörperchen

Gleichgewichtsformen roter Blutkörperchen können durch die Theorie zur Kopplung elastischer Schalen und der durch unterschiedliche Flächen der Schalen verursachte spontane Krümmung verstanden werden [11], [82]. Experimentell lassen sich Änderungen der Gleichgewichtsform bei

roten Blutkörperchen durch verschiedenste Agentien bewirken, die eine Flächenänderung entweder in einer Lipidmonolage der Lipiddoppelschicht oder des Zytoskeletts erzeugen [77], [78]. Solch eine Flächenänderung wirkt sich auch auf die mechanischen Eigenschaften der Membran aus. Von Wortis et al. wurde die Morphologie (insbesondere Länge und Radius der Ausbeulungen) von Echinozyten als Funktion elastischer Eigenschaften berechnet [84], [89]. Damit lassen sich Echinozyten äquivalent zum Model der Flächen-Differenz-Elastizität auch als Änderung der elastischen Eigenschaften der Membran verstehen. Entscheidend ist dabei das Verhältnis von Biegeelastizität κ_b zur Scher- bzw. Dehnungselastizität μ , womit eine charakteristische Längenskala

$$\Lambda_{el} = \sqrt{\kappa_b/\mu} \approx 0,28 \text{ nm} \quad \text{Gl. 21}$$

für Blutkörperchen definiert werden kann [89]. Für Deformationen oberhalb dieser Längenskala dominieren die scher- bzw. dehnungselastischen Eigenschaften das Verhalten bzw. die Morphologie der Membran und unterhalb die Biegeelastizität (vgl. auch Abbildung 17) [89] [83], [116].

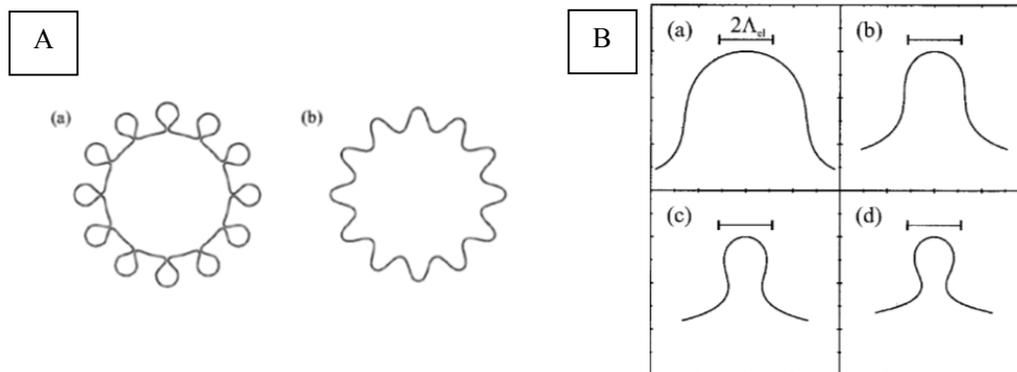


Abbildung 17 A: Bei ausreichend positiver spontaner Krümmung bilden sich bei nicht-scherelastischen Vesikeln Abschnürungen an der Oberfläche (a). Diese Formen sind für Scherelastische Vesikel energetisch ungünstig, da im Bereich der engen Hälse hohe Scherungen auftreten (b). **B:** Verschiedene Formen echnozytischer Ausbeulungen für ansteigende Werte von $\Delta a_0 = \frac{\Delta A_0}{A}$ mit Flächenunterschied ΔA_0 der spannungsfreien Fläche und der spannungsfreie Gesamtfläche A : der Membran bei konstantem Λ_{el} .

Aus diesem theoretischen Model ergeben sich Echinozyten des Typ III (sphärischer Körper mit einigen Dutzend Ausbeulungen) mit regelmäßig angeordneten Ausbeulungen, die hexagonal dichtesten Packungen entsprechen. Die hexagonale Grundstruktur des Zytoskeletts spiegelt sich somit in der Morphologie von Echinozyten wider. Ist die Gesamtzahl der Ausbeulungen nicht mit einer hexagonalen Anordnung verträglich, so bilden sich entsprechende Defektstrukturen. In der Realität bilden sich aufgrund thermischer Fluktuationen zusätzliche Defekte und man erwartet weniger regelmäßige Morphologie. Dennoch finden sich häufig Echinozyten mit hexagonaler Überstruktur, wie in Abbildung 18 dargestellt. Ebenso erkennt man bei noch nicht vollständig ausgebildeten

Formen, dass sich die Ausbeulungen in Zweier- oder Dreiergruppen angeordnet sind, was vermutlich auf kooperative Effekte langer Reichweite zwischen den einzelnen Ausbeulungen zurückzuführen ist [89].

Die in Abbildung 18 gezeigten Echinozyten wurden durch alkalisches Medium erzeugt, wobei in der untersuchten Probe ebenso häufig verschiedene stomatozytische Formen vorhanden waren (vgl. Abbildung 19, C und D). Der Mechanismus pH-induzierter Formumwandlung ist dabei noch nicht genau verstanden. In der Literatur wird sowohl von der Bildung stomatozytischer, als auch echinozytischer Formen bei alkalischem pH-Wert berichtet [64], [81]. Neben pH-induzierten Änderungen elektrostatischer Wechselwirkungen (der isoelektrische Punkt von Spektrin liegt bei $\text{pH} \approx 4,8$ [64]) gilt die Dissoziation von Bande 3 und Ankyrin als wichtige Ursache für die pH-induzierte Formumwandlung [128].

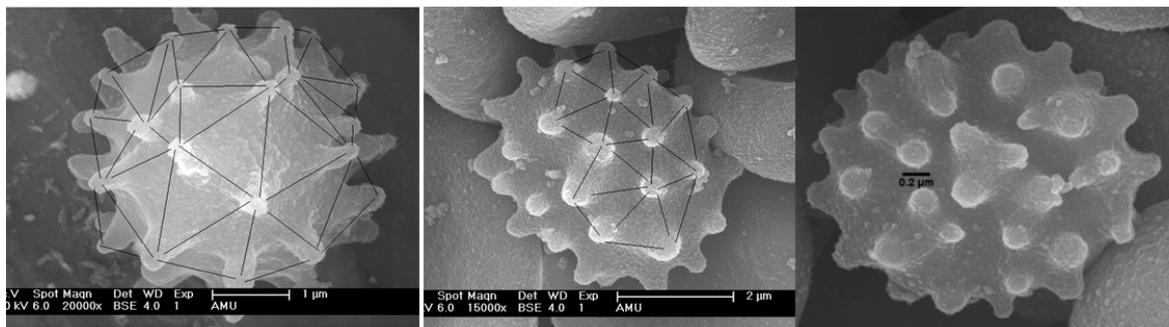


Abbildung 18: Echinozyten bei alkalischem pH-Wert ($\text{pH}=10$). Bild links und mitte: in der räumlichen Anordnung der Ausstülpungen von Echinozyten ist eine hexagonale Überstruktur deutlich erkennbar. Diese ist auf den hexagonale Grundstruktur des darunter liegenden Zytoskeletts zurückzuführen [89]. Bild rechts: die Ausbeulungen sind jeweils zu zweier oder dreier Gruppen angeordnet, was kooperative Wechselwirkungen zwischen den Ausbeulungen vermuten lässt [89].

Offensichtlich beeinflussen hier mehrere kompetitive Mechanismen die pH-induzierte Formumwandlung. Dabei können natürliche Unterschiede in den Eigenschaften der Erythrozyten dazu führen, dass sowohl stomatozytische als auch echinozytische Formen nebeneinander auftreten, wie in Abbildung 19 (rechts oben und unten) zu sehen ist. Ein ähnliches Bild zeigten Erythrozyten bei nach Inkubation bei erniedrigtem pH. Im Gegensatz dazu erhält man durch Inkubation in BSA-haltigem Medium (BSA. Bovin Serum Albumin) ausschließlich Stomatozyten (Abbildung 19 A und B). BSA entfernt das in der äußeren Monolage enthaltene Lipid Lysolecithin und ändert damit sehr spezifisch allein die spontane Krümmung der Lipiddoppelschicht [81], was einheitlich Stomatozyten ergibt. Das Zytoskelett wird durch BSA nicht beeinflusst.

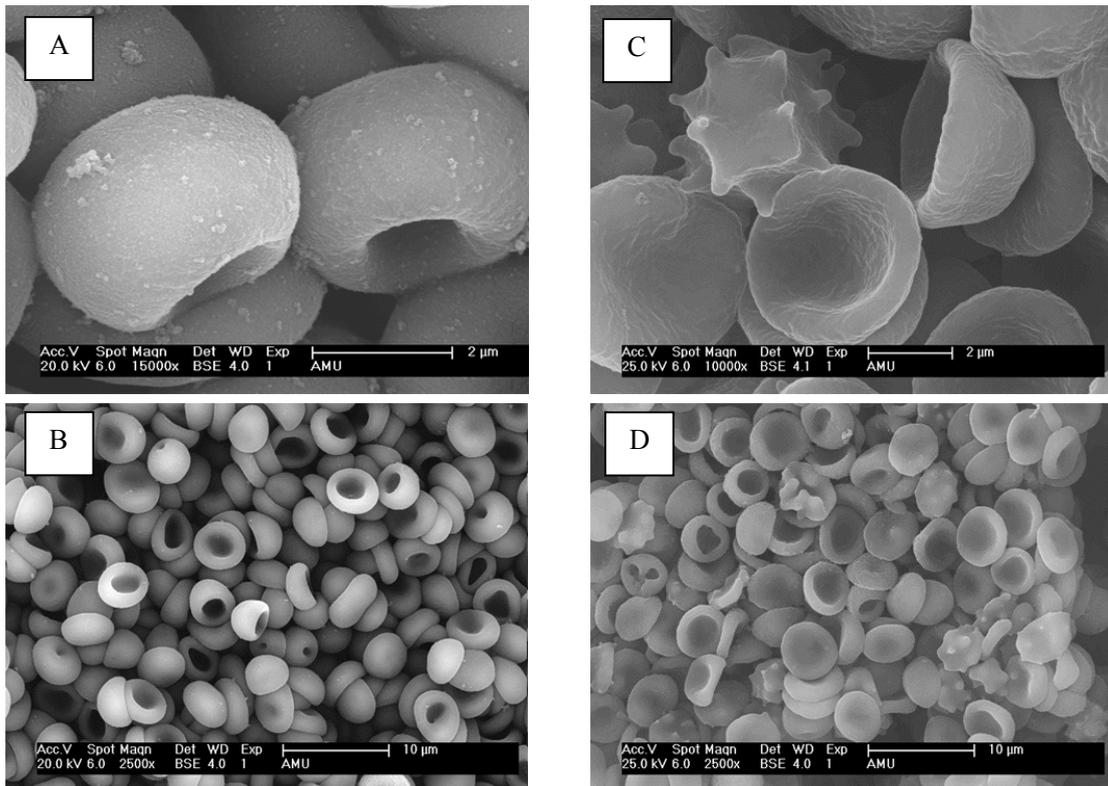


Abbildung 19 A und B: Sehr regelmäßige (rotationssymmetrische) Stomatozyten, hervorgerufen durch Behandlung mit BSA, welches die spontane Krümmung C_0 der Plasmamembran ändert, indem es Lysolecithin aus der äusseren Lipidmonolage entfernt [81]. **C und D:** Hier sind die Formumwandlungen durch stark alkalisches Medium verursacht (pH 11), was vermutlich auf eine reduzierte Kopplung zwischen Plasmamembran und Zytoskelett zurückzuführen ist (Entkopplung zwischen Ankyrin Bande 3) sowie auf eine Expansion des Zytoskeletts [89] Hier führen vermutliche verschiedene, kompetitive Mechanismen zu Ausbildung echinozytischer und stomatozytischer Formen nebeneinander.

Erhöht man die charakteristische Länge Λ_{e1} indem man die Biegesteifigkeit der Membran erhöht, so kann die Bildung von Echinozyten vollständig unterbunden werden. Von der Chemikalie Diamid ist bekannt, dass sie die elastischen Module der Membran erhöht und die Bildung von Echinozyten unterbindet [116]. Die genaue Wirkungsweise von Diamid wird in Kapitel 8 beschrieben. Mit Diamid inkubierte Zellen weisen signifikant rundere, dickere Formen auf und in keiner der untersuchten Proben traten Echinozyten auf. Im Gegensatz dazu wurde in den Präparaten nativer Erythrozyten immer ein geringer Prozentsatz echinozytischer Formen beobachtet. Dies lässt den Schluss zu, dass sich durch Diamid Behandlung das Biegemodul der Membran signifikant stärker erhöht und somit die Ausbildung der Echinozyten-Beulen unterbunden wird (vergleiche hierzu Kapitel 8). Eine geringe Anzahl an Sphäroechinozyten, die charakterisiert sind durch viele kleine, vergleichsweise spitze Ausbeulungen, sind nach Behandlung mit Diamid zu beobachten (Abbildung 20). Diese können durch eine erhöhte Fragilität der Erythrozytenmembran erklärt werden, da Diamid die Bindung zwischen Spektrin und Aktin schwächt [129].

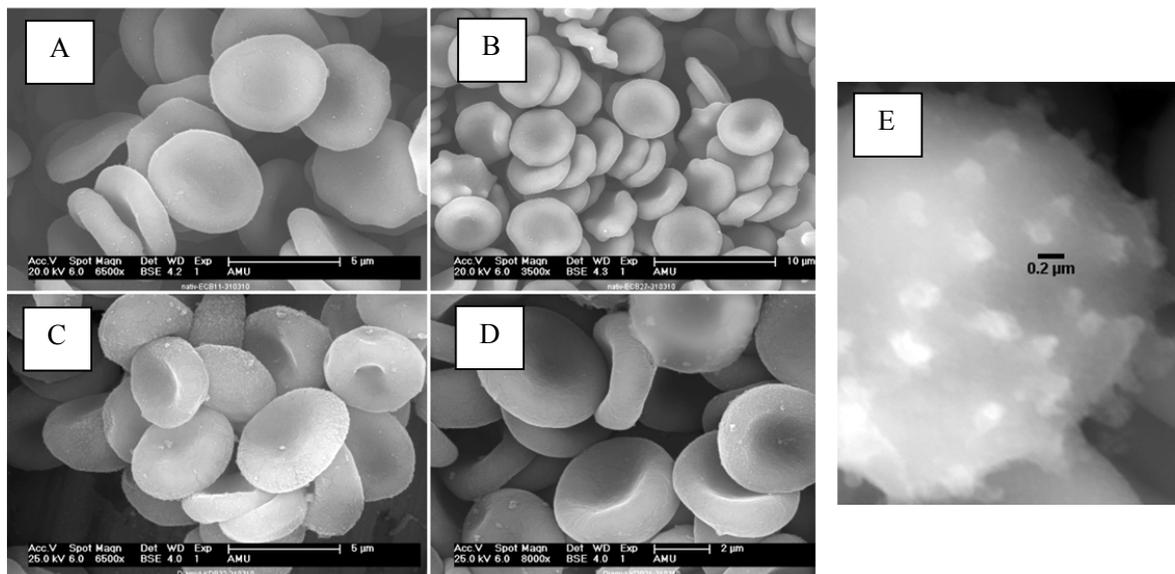


Abbildung 20 A und B: Native rote Blutkörperchen, Diskozyten und Echinozyten Typ I mit unregelmäßiger Oberfläche bzw. leichten Ausbeulungen. C und D: Bei Diamid behandelten Blutkörperchen treten keine Echinozyten Typ I-III auf. Diese besitzen ein erhöhtes Schermodul, was die Bildung starker lokal gekrümmter Oberflächen verhindert [83] [89], [116]. E: Beobachtung von Sphäroechinozyten nach Behandlung mit Diamid. Diamid erhöht die Fragilität der Membran roter Blutkörperchen [129]. Die auffällig kleinen Ausbuchtungen gehen vermutlich mit einer Fragmentierung der Spektrin-Aktin-Bindungen einher. Die maximale Anzahl von Ausstülpungen ist bei normalem Verhältnis von Scherelastizität zu Biegesteifigkeit auf etwa 70 beschränkt [89], im Falle der Sphäroechinozyten durch Diamidbehandlung ist deren Anzahl deutlich erhöht.

4.5 Zell-Adhäsion

In ausreichend großen Blutgefäßen und bei geringen Scherraten, besonders in den an das Kapillarsystem angrenzende Venolen, lagern sich Blutkörperchen stapelförmig aneinander. Dabei verstärken Makromoleküle mit einem hydrodynamischen Radius größer als 4 nm die Wechselwirkungen zwischen den Blutkörperchen, während kleinere Makromoleküle das Gegenteil bewirken [130]. Im Blutstrom ist beispielsweise bei entzündlichen Erkrankungen die Anzahl Aggregat fördernder Makromoleküle (z.B. Fibrinogen) erhöht. Große Stapel von Erythrozyten fanden sich in Erythrozyten Präparaten eines Spenders nach einem Hörsturz, wie in Abbildung 21 gezeigt. Dies ist vermutlich auf erhöhte Entzündungswerte zurückzuführen.

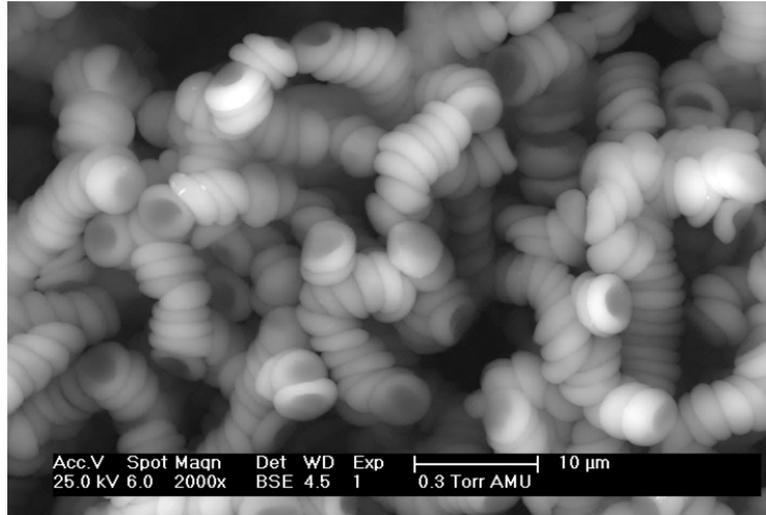


Abbildung 21: der sogenannte Geldrolleneffekt wird bei roten Blutkörperchen unter anderem durch Wechselwirkungen mit Polymeren verstärkt auf, die beispielsweise bei Entzündungen vermehrt im Blut vorhanden sind. (hier: Spenderblut von einem Patient nach Hörsturz und Einnahme des Wirkstoffes Pentooxyfillin).

5 Formänderung roter Blutkörperchen im Kapillarfluss

"Understanding the selection of shapes and dynamics among a large manifold of possibilities is a challenging problem." Kaoui, Biros, Misbah, 2009 [99]

5.1 Einleitung

Rote Blutkörperchen nehmen fast 50% des Blutvolumens ein, ihre elastischen Eigenschaften und ihr dynamisches Verhalten im Fluss beeinflussen damit maßgeblich den Blutfluss. Obwohl der Zusammenhang zwischen den Fließeigenschaften (*Rheologie*) des Blutes und den Eigenschaften der Blutkörperchen insgesamt gut erforscht ist, so ist das komplexe Verhalten der Blutkörperchen im Kapillarfluss vergleichsweise wenig untersucht und verstanden, gerade auch aus Sicht der Biophysik.

Wenn rote Blutkörperchen durch das Kapillarsystem unseres Körpers fließen, verformen sie sich entsprechend der wirkenden hydrodynamischen und viskosen Kräfte, um ihren Strömungswiderstand zu verringern [90], [131]. Symmetrische Fallschirmformen (*Parachute*) und unsymmetrische Pantoffelformen (*Slipper*) im Kapillarfluss wurden in experimentellen Arbeiten *in vivo* und *in vitro* beschrieben [98], [132-136]. Generell sind diese dynamischen Formen roter Blutkörperchen dadurch stabilisiert, dass sie den Flusswiderstand verringern [90]. Durch die Verformung tragen die Blutkörperchen zur viskosen Dissipation von Energie bei, sie erleichtern den Blutfluss. Dies spiegelt sich auch in makroskopischen Messgrößen wieder, z.B. in der Abnahme der Viskosität des Blutes mit zunehmender Scherrate, ein Phänomen Nicht-Newtonscher Flüssigkeiten, das auch als Shear Thinning bekannt ist [134]. Erst vor kurzem berichteten Forsyth et al., dass offensichtlich nicht nur die Deformation der Blutkörperchen im Scherfeld für das Shear Thinning eine bedeutende Rolle spielt, sondern dass auch die Bewegungsform der Blutkörperchen mit einer Abnahme der Bulk-Viskosität korreliert [137]. Demnach tritt Shear Thinning beim Übergang verschiedener Bewegungs-Regimes auf, nämlich wenn Blutkörperchen von ihrer taumelnden starre-Teilchen-Bewegung in die Panzerkettenbewegung übergehen. Diese Form- und Bewegungsübergänge sind mit den verschiedenen Regimes im Kapillarfluss vergleichbar und nicht zuletzt deswegen sehr interessant zu untersuchen.

Gerade die Formumwandlung roter Blutkörperchen im Kapillarfluss ist experimentell bisher nur wenig erforscht. In einer experimentellen Studie wurden unlängst unsymmetrische Formen im Kapillarfluss bei hohen Geschwindigkeiten systematisch untersucht [98]. Die Ergebnisse dieser Studie sind allerdings nur für wenige hämolytische Erkrankungen relevant. In normal-physiologischen Scherflüssen sind insbesondere kritische Parameter für die Formumwandlung nicht genau bekannt. Weder der Einfluss des Poiseuille-Flusses noch der Einfluss von Wandwech-

selwirkungen ist hinreichend beschrieben und verstanden. Mit dieser Fragestellung beschäftigt sich dieses Kapitel dieser Arbeit. Hierfür wurde die dynamische Formänderung roter Blutkörperchen in unterschiedlichen Kapillaren in Abhängigkeit von Kapillardurchmesser und Flussgeschwindigkeit untersucht. Insgesamt wurden Blutproben von über 40 Spendern evaluiert und mehrere tausend, einzeln durch künstliche Kapillaren fließende Blutkörperchen ausgewertet.

Einige wichtige Aspekte aus der Literatur

Um das Auftreten der verschiedenen Formen roter Blutkörperchen im Kapillarfluss besser zu verstehen, werden häufig einfachere Modellsysteme, vor allem Lipidvesikel, herangezogen. Für Lipidvesikel, die als flüssigkeitsgefüllte Lipidmembranen roten Blutkörperchen relativ ähnlich sind, lässt sich das Auftreten von fallschirm- und pantoffelartigen Formen durch die Charakteristika des Poiseuille-Flusses erklären [99], [131], [138]. Als weiches, deformierbares Objekt bewegen sich die Vesikel genau wie Blutkörperchen im druckgetriebenen Flussfeld entlang des Geschwindigkeitsgradienten hin zur Mitte des Kanals [48], [139], [140]. In der Mitte nimmt es eine Fallschirm- oder Projektil-ähnliche Form an, was als direkte Konsequenz des parabolischen, rotations-symmetrischen Flussprofils verstanden werden kann [131]. Solange sich das Vesikel nicht genau mittig in der Kapillare bewegt, besitzt es eine längliche, ovale Form. Weiterhin müssen die hydrodynamischen Kräfte gegenüber der Biegesteifigkeit der Membran groß genug sein, um das Vesikel (oder auch ein Blutkörperchen) entsprechend verformen zu können [99], [131].

Das Auftreten von Pantoffel-ähnlichen Formen bei Blutkörperchen wird häufig allein durch eine nicht mittige Platzierung im parabolischen Flussprofil erklärt [98], [134]. Eine weitere mögliche Erklärung, warum Pantoffel-ähnliche Formen stabil sein können, erhalten Kaoui et al. aus einer Simulation zweidimensionaler Vesikel-Modelle [99]. Demnach treten stabile, unsymmetrische Vesikelformen im Poiseuille Fluss aufgrund einer Bifurkation im dynamischen Phasendiagramm auf, in Abhängig von ihrer reduzierten Fläche (analog dem reduzierten Volumen im Dreidimensionalen) und der Flussgeschwindigkeit. Die unsymmetrischen Formen sind für bestimmte Parameter durch eine verringerte Schlupfgeschwindigkeit (*slip velocity*) stabilisiert. Die Schlupfgeschwindigkeit ist der Betrag der Geschwindigkeit, um den sich das Objekt langsamer bewegt (in seinem Schwerpunkt), verglichen mit einem ungestörten Fluid an dieser Stelle. Das Modell von Kaoui betrachtet damit das reduzierte Volumen und die Membran-Biegesteifigkeit als die minimal notwendigen Bestandteile in einem parabolischen Fluss für das Auftreten stabiler, pantoffelförmiger Vesikel. Übertragen auf rote Blutkörperchen interpretieren sie ihre Ergebnisse in der Hinsicht, dass für das Auftreten von stabilen Pantoffelformen weder Gefäßwände noch eine scherelastische Membran notwendig sind.

In einer weiteren theoretischen Arbeit haben sich Noguchi et al. mit der Formumwandlung roter Blutkörperchen im Kapillarfluss beschäftigt [90]. In deren Modell sind damit (im Gegensatz zu den beiden vorher beschriebenen Arbeiten) nicht nur die Biegesteifigkeit der Membran, sondern auch die scherelastischen Eigenschaften des Zytoskeletts enthalten. Diese Arbeit beschreibt einen direkten Zusammenhang zwischen einer kritischen Flussgeschwindigkeit, bei der die Formum-

wandlung roter Blutkörperchen stattfindet, und Eigenschaften der roten Blutkörperchen, wie Zellradius, Schermodul und Biegesteifigkeit der Membran. Unsymmetrische, pantoffelähnliche Formen treten dabei als reiner Übergangsform im Bereich der kritischen Geschwindigkeit auf, die sich unweigerlich weiter in die Fallschirmform umformen.

Die theoretischen Arbeiten liefen wichtige Ansätze zu einem besserem Verständnis, wodurch die Formumwandlung getrieben werden. Eine klare Antwort auf die Frage, ob die Pantoffelform bei roten Blutkörperchen tatsächlich nur eine reine Übergangsform oder eine stabile dynamische Form ist, können sie nicht bieten. Diese Fragen werden in dieser Arbeit experimentell untersucht und geklärt.

5.2 Experimente und Ergebnisse

5.2.1 Allgemeines zur Durchführung und Auswertung der Experimente

Die Formänderung und das dynamische Verhalten der roten Blutkörperchen wurde zunächst in PDMS-Kapillaren mit einem gleichförmigen, konstantem Querschnitt von $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ untersucht. Der Fluss wurde hydrostatisch getrieben und im Experiment schrittweise in einem Geschwindigkeitsbereich von $10\ \mu\text{m/s} < v_{RBC} < 3500\ \mu\text{m/s}$ verändert. Die Konzentration der Blutkörperchen wurde dabei so eingestellt, dass diese weitestgehend einzeln durch die Kapillaren fließen. Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels Hochgeschwindigkeits-Videoanalyse. Die Blutkörperchen wurden entsprechend der am häufigsten beobachteten Formen kategorisiert, also nach bikonkaven Diskozyten, pantoffelförmigen Blutkörperchen, rotationssymmetrischen Fallschirmformen. Diese Formen entsprechen auch den am häufigsten in der Literatur beschriebenen und theoretisch untersuchten Formen [90], [132-134]. Mit deutlich geringerer Häufigkeit wurden andere, unsymmetrische Formen beobachtet, die keiner dieser drei Formen entsprechen und deshalb in eine zusätzliche Kategorie „Andere“ zusammengefasst wurden.

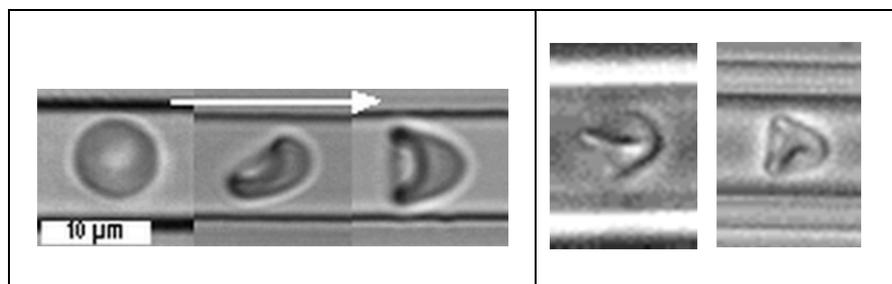


Abbildung 22: Links: Typische Formen roter Blutkörperchen im Kapillarfluss mit zunehmender Geschwindigkeit. Von rechts nach links: Diskozyt, Pantoffelform, Fallschirmform. Rechts: Beispiele für Formen roter Blutkörperchen, die der Kategorie "Andere" zugeordnet sind.

Für sämtliche Messungen wurde der prozentuale Anteil der verschiedenen Formen der Blutkörperchen und deren Geschwindigkeit ermittelt. Sämtliche Geschwindigkeitsangaben beziehen sich auf die mittlere Geschwindigkeit der Blutkörperchen bei dem jeweiligen angelegten, konstanten hydrostatischen Druck. Um möglichst allgemeingültige Ergebnisse zu erhalten, wurde in den Experimenten Blut von verschiedenen Spendern verwendet.

Im System mit konstantem Kapillarquerschnitt wird zunächst der zeitliche Verlauf der Formumwandlung untersucht (*Wie schnell formen sich die Blutkörperchen bei konstanten angreifenden Kräften um?*). Weiterhin wurde die Häufigkeit der verschiedenen stabilen Formen bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten bestimmt. (*Bei welchen Geschwindigkeiten treten welche Formen mit welcher mittleren Häufigkeit auf?*) Im Experiment wurde die Geschwindigkeit schrittweise erhöht und die Blutkörperchen sind an der Kanalposition, an der sie evaluiert werden, in ihre dynamische Gleichgewichtsform relaxiert. Der Übergang zwischen den verschiedenen dynamischen Regimes, in denen die Formumwandlungen stattfinden, wurde damit nicht kontinuierlich, sondern diskontinuierlich ermittelt.

Für einen umfassenderen Zusammenhang zwischen Kapillarradius, Geschwindigkeit und Formänderung wurden Experimente in sich langsam verjüngende Glaskapillaren (Öffnungswinkel $0,2^\circ \pm 0,05^\circ$) durchgeführt (*Wie sähe ein Phasendiagramm dynamischer Blutkörperchenformen in Abhängigkeit von ihrer Geschwindigkeit und dem Kapillardurchmesser aus?*). Analog zu den Experimenten im PDMS-Kanal mit konstantem Querschnitt wurde der prozentuale Anteil der verschiedenen Formen an verschiedenen Positionen der Kapillare (entsprechend unterschiedlichen Kapillardurchmessern) und bei verschiedenen hydrostatischen Drücken (entsprechend mittleren Blutkörperchen Geschwindigkeiten von $10 \mu\text{m/s} < v_{RBC} < 4600 \mu\text{m/s}$) bestimmt. Bei den Experimenten in den langsam zulaufenden Glaskapillaren nehmen die Kräfte, die auf die Blutkörperchen wirken, kontinuierlich mit der Geschwindigkeit und mit dem sich verringerndem Abstand zur Kapillarinnenwand zu. Der Übergang zwischen verschiedenen dynamischen Regimes, in denen die Formumwandlungen stattfinden, kann somit kontinuierlich beobachtet werden. Diese Setup entspricht damit eher physiologischen Bedingungen, auch hier ändern sich die Flussgeschwindigkeit und der Querschnitt der Kapillaren kontinuierlich.

Im Kapillarfluss wirkende Kräfte

Auf die Blutkörperchen, die sich mit einem Abstand z zwischen der Kapillarwand und ihrer Membran im Kapillarfluss und der Geschwindigkeit v bewegen, wirkt eine Reibungskraft

$$F = \eta A \frac{v}{z} \quad \text{Gl. 22}$$

auf die Fläche A der Membran. Die wirkende Scherspannung (*viskose Schubspannung*) entspricht

$$\sigma_\eta = \frac{dF}{dA} = \eta \frac{v}{z} \quad \text{Gl. 23}$$

und ist damit ebenso direkt proportional zur Flussgeschwindigkeit. Bewegt sich ein Blutkörperchen mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare mit gleichbleibendem Querschnitt, so wirkt eine konstante Kraft auf das Blutkörperchen.

Vorbemerkung zur zeitabhängigen und kraftabhängigen Beschreibung der Formumwandlung

Für die Experimente im Mikrokanal mit konstantem Querschnitt (PDMS-Kanal) wird die Kraft schrittweise zwischen den einzelnen Messungen variiert. Bei konstanter Geschwindigkeit bleiben hier die wirkenden Kräfte über die gesamte Kanallänge konstant. Trägt man die Häufigkeit der verschiedenen Formen gegen die Zeitkoordinate (entsprechend verschiedenen Kanalpositionen bei konstanter Geschwindigkeit) auf, lassen sich zeitabhängige Raten (analog zu Relaxationszeiten) für die Formumwandlung bei der jeweiligen Geschwindigkeit (bzw. wirkenden Kraft) bestimmen (siehe Kapitel 5.2.3, Abschnitt *Zusammenhang zwischen zeit- und geschwindigkeitsabhängigen Umwandlungsraten*). Diese Raten beschreiben praktisch die Lebensdauer der jeweiligen Form und dienen damit als Kriterium, ob eine Form für bestimmte Parameter stabil ist. Für die Auswertung wird die Häufigkeit der verschiedenen dynamischen Formen gegen ihren zurückgelegten Weg (0,5 mm; 1,0 mm; 2,0 mm; 2,5 mm und 4,5 mm vom Einlass) aufgetragen. Auch der Einfluss, den die wirkenden Kräfte bei einer jeweiligen Geschwindigkeit auf die zeitabhängigen Raten haben, wird in Abschnitt 5.2.3 bestimmt. Hierfür werden die zeitabhängigen Raten gegen die jeweilige Geschwindigkeit (die hier direkt proportional ist zur Scherrate und zur Schubspannung) der Blutkörperchen im Kapillarfluss aufgetragen. Damit lässt sich eine für dieses System ein allgemeiner, kraftabhängiger Parameter \tilde{k} bestimmen, der beschreibt, wie schnell Blutkörperchen bei einer bestimmten wirkenden Schubspannung (entsprechend der Geschwindigkeit im Kapillarfluss) in ihre jeweilige dynamische Gleichgewichtsform relaxieren.

Betrachtet man die Häufigkeit der dynamischen Formen mit zunehmender Flussgeschwindigkeit an einer Position im Kanal, an der sie sich bereits in ihrem dynamischen Gleichgewicht befinden, so lässt sich auch hier eine Verteilung (mit einer entsprechenden kraftabhängigen Rate) für die Formumwandlung definieren (vgl. Kapitel 5.2.3, Abschnitt *Geschwindigkeitsabhängige Verteilung stabiler dynamischer Formen*). So lässt sich die statistische Häufigkeit der verschiedenen dynamischen Gleichgewichtsformen für verschiedene Geschwindigkeiten in der gemessenen Kapillargeometrie beschreiben.

5.2.2 Statistisch verteiltes Auftreten der dynamischen Formen

In einer vorangehenden Arbeit wurden rote Blutkörperchen in hyperbolisch zulaufenden Kapillaren untersucht [141]. In diesem Experiment wurden Blutkörperchen eines einzigen Spenders verwendet und die Häufigkeit der dynamischen Formen abhängig von ihrer Geschwindigkeit ermittelt. Anhand dieser Daten lässt sich insbesondere die typische, statistische Verteilung der dynamischen Formen mit zunehmenden Geschwindigkeiten einer einzigen Erythrozyten-Population sehr gut verdeutlichen. Da die Kanalgeometrie sich von den in dieser Arbeit durchge-

fürten Experimenten unterscheidet, ist ein exakter quantitativer Vergleich nicht unbedingt möglich. Im Unterschied zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden die Häufigkeiten der verschiedenen Formen direkt nach dem Austritt aus der Kapillare (Öffnung: $2,5 \mu\text{m} \times 7,5 \mu\text{m}$) erfasst. Da die Blutkörperchen ausreichend langsam in ihre Ruheform relaxieren (vgl. Kapitel 7), entspricht die erfasste Form der dynamischen Form, die sie auch direkt vor dem Austritt aus der Kapillare haben. Qualitativ eignen sich diese Daten daher sehr gut, um die typische Verteilung der Häufigkeit der einzelnen Formen mit zunehmender Geschwindigkeit im Kapillarfluss zu veranschaulichen.

Trägt man die Häufigkeit der Formen gegen ihre maximale Geschwindigkeit auf, auf die sie in der Kapillare beschleunigt wurden, so erhält man die in Abbildung 23 gezeigte Verteilung. Die Daten zeigen eine für chemisch-physikalische Prozesse typische Verteilung, die in der statistischen Thermodynamik zur Beschreibung von Systeme mit sehr großer Teilchenzahl (kanonische Ensemble) verwendet wird [6].

Um den Verlauf der Formumwandlung genauer zu verstehen, wird hier die Formumwandlung als zweistufiger, unidirektionaler Prozess betrachtet, bei dem die Pantoffelform als "Zwischenprodukt" auftritt. Ähnlich wie bei einer chemischen Reaktion oder einer Phasenumwandlung bei Festkörpern, bei der Energie z.B. in Form von Wärme zugeführt werden muss, wird hier die nötige Energie für die Formumwandlung durch die hydrodynamischen Kräfte bereitgestellt. Die Formumwandlung kann schematisch beschrieben werden durch [142]:



mit den Raten- bzw. Relaxationskonstanten a_1 und a_2 , die hier als Formumwandlungsraten interpretiert werden. Die Raten a_1 und a_2 charakterisieren also den Verlauf der Formumwandlung (entsprechend der Änderung der Häufigkeit der Formen) mit zunehmender Geschwindigkeit im Kapillarfluss. Die Ratenkonstanten a_1 und a_2 berechnen sich allgemein nach $a_1 = a'_1 e^{f\Delta x/k_B T}$ und $a_2 = a'_2 e^{f\Delta x/k_B T}$ und beinhalten damit den Einfluss der äußeren Kraft f , die eine Längenänderung Δx bewirkt (vgl. Abbildung 24). In dem betrachteten Modell entspricht die Kraft f den auf das Blutkörperchen wirkenden hydrodynamischen Kräften. Weiterhin entspricht Δx einer Längenänderung in der Membran des Blutkörperchens, beispielsweise einer Streckung oder Dehnung des Spektrins oder einer Auffaltung von Spektrin-Domänen [67], [143-145] (vgl. auch Ergebnisse aus Abschnitt 5.2.3). Da hier PDMS-Kapillaren mit abnehmendem Querschnitt verwendet wurden, ist die auf die Blutkörperchen wirkende Kraft f nicht konstant und soll hier auch nicht näher abgeschätzt werden.

Die Formumwandlung wird also getrieben durch die Kräfte des äußeren Flusses, die das Blutkörperchen deformieren. Solange diese Kräfte wirken, ist die Rück-Umwandlung sehr unwahrscheinlich und kann im Formumwandlungs-Schema (Gl. 24) vernachlässigt werden. Die Ratenkonstante a_1 für die Abnahme der Diskozyten bei der Geschwindigkeit v erhält man aus der Anpassung der Daten an eine exponentiell abfallende Funktion:

$$D(v) = C_1 e^{-va_1} \quad \text{Gl. 25}$$

mit einer relativen Anfangskonzentration $C_1 = 1$ der Diskozyten. Die Ratenkonstante a_2 wird aus einer sigmoiden Funktion (Boltzmann-Fit) erhalten:

$$F(v) = \frac{(C_{2s} - C_{2e})}{1 + e^{(v-v_0)a_2}} + C_{2e} \quad \text{Gl. 26}$$

mit relativer Konzentration der Fallschirmform $C_{2s} = 0$ zu Beginn und $C_{2e} = 1$ nach der Formumwandlung, der Ratenkonstante a_2 entsprechend der Steigung und zugehöriger x-Position v_0 im Wendepunkt (entsprechend dem halben Maximum der Umwandlung) der Kurve. Die Geschwindigkeit, bei der die Häufigkeit von Diskozyt beziehungsweise Fallschirmform 50 % beträgt, wird als kritische Geschwindigkeit der Formumwandlung definiert, mit v_{crit_1} bei einer Häufigkeit von 0,5 für die Diskozyten und ebenso v_{crit_2} bei einer Häufigkeit von 0,5 für die Fallschirmform.

Man erhält für die Abnahme der Diskozyten $a_1 = 0,020 \pm 0,002 (\mu\text{m}/\text{s})^{-1}$ und für die Zunahme der Fallschirmform $a_2 = 0,027 \pm 0,002 (\mu\text{m}/\text{s})^{-1}$ mit Geschwindigkeit $v_{crit_2} = 232 \pm 7 (\mu\text{m}/\text{s})^{-1}$. Die Zunahme der Häufigkeit der Pantoffelform mit der Geschwindigkeit entspricht in diesem Experiment der Abnahme der Diskozyten. Ebenso entspricht die Rate für die Abnahme der Pantoffelform der Zunahme der Fallschirmform. Würde weiterhin die Häufigkeit der Fallschirmform allein von den beiden Raten abhängen, mit der die Häufigkeit des Diskozyt abnimmt und die der Fallschirmform zunimmt, ließe sich die Häufigkeit der Pantoffelform in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit wie folgt berechnen [142]:

$$P(v) = \frac{C_{1s}}{a_2 - a_1} (e^{(-va_1)} - e^{(-va_2)}) \quad \text{Gl. 27}$$

Setzt man die entsprechenden Werte ein, erhält man die in Abbildung 23 als punktierte, schwarze Linie gezeigte Kurve, die stark von der tatsächlich gemessenen Häufigkeit der Pantoffelform abweicht. Die Pantoffelform ist im Experiment länger als eine reine Zwischenstufe stabil. Die Fallschirmform beginnt sich erst bei stärkeren hydrodynamischen Kräften zu bilden, entsprechend Geschwindigkeiten von etwa $v_{crit_2} = 232 \pm 7 (\mu\text{m}/\text{s})^{-1}$. Damit wird deutlich, dass die Bildung der Fallschirmform nicht allein von der Bildung seiner Vorstufe, der Pantoffelform, abhängt. Es sind in diesem System also noch weitere Faktoren vorhanden, die die Umwandlung von Pantoffelform in Fallschirmform kontrollieren, beispielsweise die Geometrie der Kapillare.

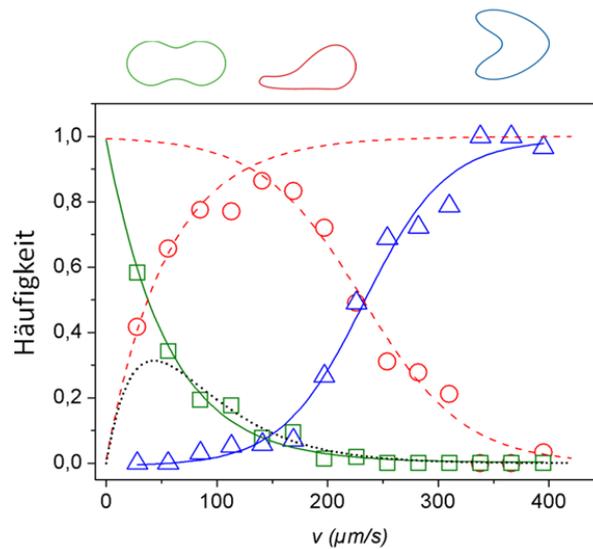


Abbildung 23: Änderung der Häufigkeit von Diskozyt (grüne Vierecke), Pantoffelform (rote Kreise) und Fallschirmform (blaue Dreiecke) mit zunehmender Geschwindigkeit im Kapillarfluss. Die Rate a_1 , mit der die Häufigkeit der Diskozyten abnimmt, folgt einer exponentiell abnehmenden Kurve (grüne Linie). Die Zunahme der Fallschirmform entspricht einer sigmoiden Funktion (Boltzmann) mit entsprechender Ratenkonstante a_2 . Die Häufigkeit der Pantoffelform nimmt reziprok dazu zu beziehungsweise ab. Die schwarze punktierte Linie entspricht der theoretischen Häufigkeit der Pantoffelform, wenn diese allein von den Raten a_1 und a_2 abhängig wäre, d.h. wenn die Bildung der Fallschirmform sofort mit Entstehung der Pantoffelform beginnen würde. Die Diskrepanz zwischen solch einer theoretischen und der tatsächlich beobachteten Häufigkeit ergibt sich daher, dass die Bildung der Fallschirmform nicht allein von der Bildung seiner Vorstufe, der Pantoffelform, abhängt. Die Zunahme der Fallschirmform ist praktisch um $v_{crit,2} = 232 \pm 7(\mu m/s)$ nach rechts verschoben ist.

5.2.3 Formänderung in PDMS-Kanälen mit konstantem Querschnitt

Die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts veranschaulichen sehr schön den statistischen Charakter des Verhaltens roter Blutkörperchen im Kapillarfluss, wie er für biologische und biochemische Systeme typisch ist. Sie liefern bereits eindeutige Hinweise, dass die Pantoffelform keine reine Zwischenform für die Formumwandlung von Diskozyt zur Fallschirmform ist, sondern über längere Zeiträume stabil sein kann. In dem vorher beschriebenen Experiment wurde eine relativ komplexe Kanalgeometrie gewählt mit hyperbolisch zulaufender Kanalbreite. Der Kanal verengt sich zudem auf $2,5 \mu m \times 7,5 \mu m$, daher nimmt der Einfluss der Kanalwände auf das Verhalten der Blutkörperchen sukzessive zu und geht nicht als konstanter Parameter in die Raten a_1 und a_2 ein. Daher wird im Folgenden das dynamische Verhalten der Blutkörperchen in einfachen PDMS-Kanälen, mit konstantem Querschnitt untersucht werden und zwar zunächst unter geringem Einfluss der Kapillarwände. Hierbei geht die Kraft als konstanter Parameter in die Rate, die den Verlauf der Formumwandlung beschreibt, ein.

Während Diskozyt und Fallschirmform eindeutig als stabile dynamische Formen in der Literatur beschrieben sind, ist dies für die Pantoffelform nicht eindeutig geklärt [90], [99]. Ob die Pantoffel-

form eine reine Übergangsform ist oder eine eigenständige, stabile Form wird hier über die statistische Lebensdauer (bzw. Relaxation in eine stabile, dynamische Form) der verschiedenen Formen roter Blutkörperchen bei konstantem Volumenfluss genauer untersucht. Dazu wird ein PDMS-Kanal mit konstantem Querschnitt von $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ verwendet. Aus den Ergebnissen ist weiter ersichtlich, ob die Pantoffelform auch in System mit geringer Wandwechselwirkung eine stabile Form ist, oder ob sie sich mit ihrer Bildung unweigerlich in die Fallschirmform umformt.

Zusammenhang zwischen zeit- und geschwindigkeitsabhängigen Umwandlungsraten

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, lässt sich die Umwandlung der verschiedenen Formen ineinander anhand der Konzepte der statistischen Thermodynamik beschreiben. Ganz analog zu einer Phasenumwandlung im Festkörper, die beispielsweise bei erhöhter Temperatur (also mehr zugeführter Energie) schneller abläuft, wird bei den Blutkörperchen im Kapillarfluss beobachtet, dass die Formumwandlung schneller abläuft, wenn eine höhere Flussgeschwindigkeit herrscht, also dem System mehr Energie zugeführt wird. Eine molekulare Umstrukturierung des Zytoskeletts (entsprechen der Deformation des Blutkörperchens) läuft bei hohen Geschwindigkeiten also schneller ab und *vice versa*. Wie eine konstante Wirkende Kraft den Zeitverlauf (die zeitabhängige Rate) der Formumwandlung beeinflusst wird im folgendem beschrieben.

Die Formumwandlung verläuft bei konstanter Geschwindigkeit mit einer charakteristischen zeitabhängigen Rate. Für verschiedene Geschwindigkeiten sind diese zeitabhängigen Raten unterschiedlich [67], [143-145]. In Anlehnung an die Theorie des Übergangszustands für molekulare Reaktionen (Theorie von Kramer) werden hier charakteristische Raten für die Formumwandlung in Pantoffel- und Fallschirmform bei verschiedenen Geschwindigkeiten bestimmt [6], [142].

Die Rate, mit der chemische Bindungen brechen oder verknüpft werden, oder auch Proteine entfalten, ist durch die Boltzmann-Verteilung gegeben. Für die Rate k_0 solch einer molekularen Reaktion gilt [6]:

$$k_0 = \tau^{-1} \exp\left\{-\frac{G_s}{k_b T}\right\} \quad \text{Gl. 28}$$

wobei τ ein konstanter, modellabhängiger Vorfaktor ist und G_s die Freie Enthalpie der Aktivierung ("Energiebarriere") ist. Wirkt entlang der Reaktionskoordinate eine mechanische Kraft auf dieses System so verändert sich die Freie Enthalpie. Im Modell erscheint diese Kraft als Zusatzterm $-Fx$ in der freien Enthalpie, wie in Abbildung 24 schematisch dargestellt [6]. Die Freie Enthalpie der Aktivierung der Reaktion wird folglich um den Betrag $-Fa$ abgesenkt, wobei die Konstante a der räumliche Abstand zwischen Ausgangszustand A und Übergangszustand S ist (z.B. eine Längenänderung durch Auffaltung einer Proteindomäne). Für die Rate des Bindungsbruchs unter Krafteinwirkung ergibt sich daher

$$k_f = \tau^{-1} \exp\left\{-\frac{G_s - Fa}{k_b T}\right\} = k_0 \exp\left\{\frac{Fa}{k_b T}\right\} = k_0 \exp\left\{\frac{F}{F_0}\right\} \quad \text{Gl. 29}$$

mit der charakteristischen Kraft $F_0 = a/k_b T$, also dem Verhältnis von thermischer Energie und dem Abstand a . Die Konstante k_0 ist die Dissoziationsrate in Abwesenheit externer Kräfte und ergibt sich aus dem Exponent in der e-Funktion von Relaxationsprozessen. Die (zeitabhängige, exponentielle) Rate mit der eine Reaktion abläuft ändert sich also wiederum exponentiell, wenn eine zusätzliche Kraft wirkt. Dieses Modell beschreibt damit, wie unter Einwirkung einer mechanischen Kraft das Brechen von Bindungen beschleunigt wird [6].

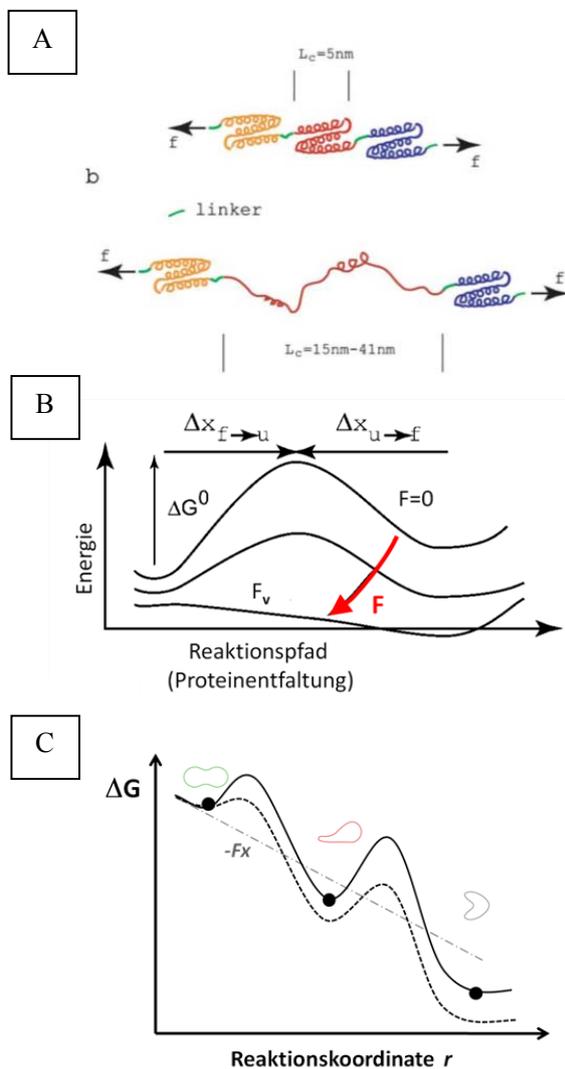


Abbildung 24 A. Entfaltung der tripelhelikalen Domänen des Spektrins, wenn eine Kraft f angreift (schwarze Pfeile). B: Idealierte Energielandschaft für einen gefalteten (f) und einen aufgefalteten Zustand (u) eines solchen Proteins ohne (Kurve mit höchster Energiebarriere) und mit Einwirkung einer Kraft F (Absenkung der Energiebarriere). Die y-Achse stellt die freie Enthalpie (Gibbs free energy) des Proteins dar (Abbildungen modifiziert aus [144]). Wirkt eine Kraft auf das gefaltete Protein (Streckung in x -Richtung), so erniedrigt sich die Energiebarriere des aufgefalteten Zustandes. Für $F = F_v$ spielen thermisch getriebene Prozesse für die Auffaltung keine Rolle mehr [146]. B: Schema zum Verlauf der freien Enthalpie für die Formumwandlung roter Blutkörperchen. Das abgebildete Schema entspricht qualitativ der Energiehyperfläche für eine hohe Geschwindigkeiten mit der Fallschirmform als Zustand geringster Energie. Die Freie Enthalpie des Systems ändert sich durch eine Kraft $-Fx$, die entlang der Reaktionskoordinate wirkt und die Raten für die Formumwandlung ändern sich entsprechend [145].

Aus der Auftragung der Häufigkeit der verschiedenen Formen roter Blutkörperchen bei einer konstanten Geschwindigkeit gegen ihre Lebensdauer (entsprechend verschiedener Positionen im

Kanal, vgl. Abbildung 25 A) wird deutlich, dass die Pantoffelform ebenso wie der Diskozyt und die Fallschirmform eine stabile Form ist. Sie wandelt sich nicht unweigerlich in die Fallschirmform um, sondern ein konstanter Anteil der Population besitzt bei mittleren Geschwindigkeiten die Pantoffelform (Abbildung 25 A). Damit kann die Pantoffelform als lokales Energieminimum (für einen bestimmten Parameterraum) für den Verlauf der Freien Enthalpie entlang der Reaktionskoordinate verstanden werden (vgl. Abbildung 24).

Weiterhin wird der Zusammenhang zwischen zeit- und geschwindigkeitsabhängiger Umwandlung bestimmt. Im $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ PDMS-Kanal wurden bei verschiedenen, konstanten Geschwindigkeiten die Raten k_f für die Änderung der Häufigkeit von Diskozyt und Fallschirmform bestimmt. Für die Abnahme der Diskozyten wird die Rate k_f aus der Anpassung der Daten an eine exponentiell abnehmende Funktion ermittelt. Für die Zunahme der Fallschirmform wird die Rate aus einer Anpassung mit einer Boltzmann-Funktion (vgl. vorherige Abschnitte) erhalten. Trägt man die einzelnen kraftabhängigen Raten k_f gegen die Scherrate $\dot{\gamma} = \frac{v_{RBC}}{x}$ (mit einem mittleren Abstand $x = 1\ \mu\text{m}$ zwischen Wand und Blutkörperchen) auf, so ergibt sich der erwartete exponentielle Zusammenhang $k_f = k_0 e^{-\tilde{k}\sigma} + m$ (vgl. Gl. 29) für die Änderung von mit zunehmender Kraft (Abbildung 25, linearer Bereich der halblogarithmischen Auftragung). Über den Zusammenhang mit der Reibungskraft $F = \eta A \frac{v}{z} = \eta A \dot{\gamma}$ (mit der Viskosität η von Wasser) bzw. der viskosen Schubspannung $\sigma = \eta \frac{dv}{dz}$ lässt sich also ein allgemeines beschreiben, wie schnell ein Blutkörperchen mit zunehmender angreifender Schubspannung in eine neue dynamische Gleichgewichtsform relaxiert. Man erhält für die Umwandlung der Diskozyten $\tilde{k} \approx 262 \pm 111 \left(\frac{\text{N}}{\text{m}^2}\right)^{-1}$ und für die Fallschirmformen $\tilde{k} \approx 664 \pm 372 \left(\frac{\text{N}}{\text{m}^2}\right)^{-1}$.

Verdeutlich man sich, dass für die Formumwandlung eine molekulare Reorganisationen im Zytoskelett nötig ist, so können die kraftabhängigen Raten k_f als die Raten verstanden werden, mit welchen sich die Proteinkonformationen in Zytoskelett ändern (vgl. Abbildung 24) [67].

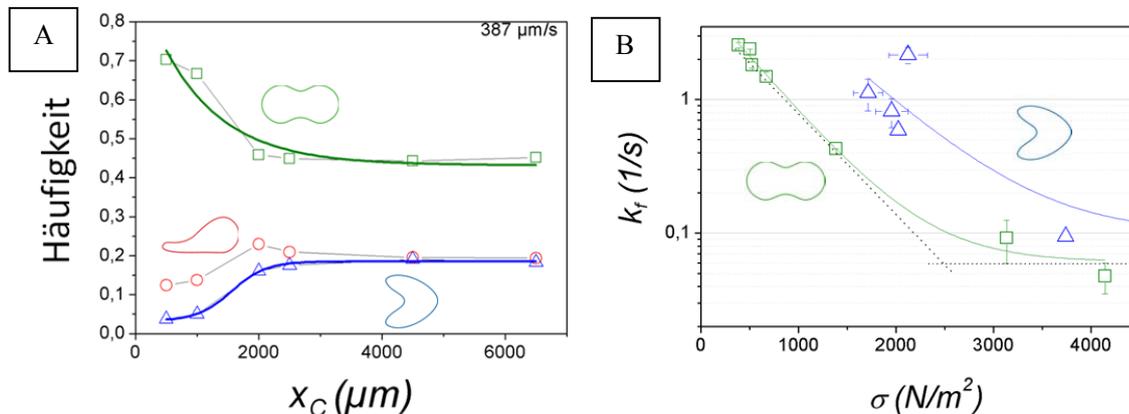


Abbildung 25 A: Änderung der Häufigkeit der verschiedenen Formen bei konstanten hydrodynamischen Kräften (zeitabhängige Umwandlungsraten). Die Verteilung der Formen relaxiert entlang der Kanalposition x_c auf konstante Werte. Dies verdeutlicht, dass die Pantoffelform eine stabile dynamische Form ist. **B:** Auftragung der kraftabhängigen Ratenkonstante k_f für die Abnahme der Diskozyten (grüne Vierecke) und die Zunahme der Fallschirmform. Die Raten ändern sich exponentiell mit der wirkenden Kraft für Scherraten größer als 2000 s^{-1} (linearerer Bereich der Fitkurven bei halblogarithmischer Auftragung). Für größere Scherraten nähern sich die Raten der Formumwandlungen einem festen Wert, denn die Umwandlung kann aufgrund von Dämpfung (Viskosität des Systems) nicht unendlich schnell ablaufen.

Geschwindigkeitsabhängige Verteilung stabiler dynamischer Formen

Die Häufigkeit von diskozytischen, pantoffelförmigen und fallschirmförmigen Blutkörperchen, die in der $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ PDMS-Kapillare in ihre dynamische Gleichgewichtsform relaxiert sind, wird gegen ihre Geschwindigkeit aufgetragen. Da Blut von verschiedenen Spendern verwendet wurde, streuen die erhaltenen Datenpunkte stärker als die Daten in Abschnitt 5.2.2. Die Datenpunkte der Diskozyten und der Fallschirmform sind entsprechend mit Boltzmannfunktionen angepasst³, woraus die kritischen Geschwindigkeiten bestimmt werden. Man erkennt, dass in diesem System für Geschwindigkeiten unterhalb von $250 \mu\text{m/s}$ nahezu alle Blutkörperchen ihre bikonkave, diskozytische Form behalten. Bei höheren Geschwindigkeiten nimmt die Anzahl der Diskozyten zugunsten der Pantoffel- und der Fallschirmform mit einer Rate von $0,0083 \pm 0,0021 (\mu\text{m/s})^{-1}$ ab. Etwa oberhalb einer Geschwindigkeit von $1000 \mu\text{m/s}$ ist die Häufigkeit der Diskozyten auf einen nahezu konstanten Wert von knapp 10% abgefallen. Parallel zur Abnahme der diskozytischen Form nimmt die Anzahl der fallschirmförmigen Blutkörperchen zwischen $250 \mu\text{m/s}$ und $1000 \mu\text{m/s}$ mit einer Rate von $0,0057 \pm 0,0020 (\mu\text{m/s})^{-1}$ zu. Bei Geschwindigkeiten über $1000 \mu\text{m/s}$ ist der Anteil der Fallschirmform nahezu konstant bei etwa 90%. Allerdings tritt im Geschwindigkeitsbereich von $750 \mu\text{m/s}$ bis $1500 \mu\text{m/s}$ eine starke, natürliche Streuung zwi-

³ für die kraftabhängige Entfaltung von Proteinen ist bekannt (z.B. aus AFM-Experimenten), dass sich z.B. je nach Messbedingungen (Kraftraten, Absolutwerte) entsprechende statistische Verteilungen sowohl einen exponentiellen als auch einen sigmoidem Kurvenverlauf zeigen. Daher ist es auch hier nicht überraschend, dass sich hier für die Verteilung der Diskozyten kein exponentiell abfallender sondern ein sigmoider Kurvenverlauf ergibt [6].

schen Blutkörperchen-Populationen von verschiedenen Patienten auf. In diesem Bereich wird auch die Pantoffelform mit einem Anteil von bis zu 30% beobachtet. Die grafische Auftragung der Häufigkeit der verschiedenen Formen mit zunehmender Geschwindigkeit ist in Abbildung 26 dargestellt, wobei die mittlere Häufigkeit von Diskozyt und Fallschirmform jeweils mit einer Boltzmann-Funktion angepasst wurden (grüne bzw. blaue Linie). Um den Geschwindigkeitsbereich für die maximale Häufigkeit der Pantoffelform zu verdeutlichen, wurden eine Kurve nach Gl. 27 an die Werte angepasst. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus dem vorherigen Abschnitt (vgl. Abbildung 23) fällt auf, dass das Maximum der Pantoffelform deutlich niedriger und, relativ zur Fallschirmform, zu höheren Geschwindigkeiten verschoben ist. Die kritischen Geschwindigkeiten (Geschwindigkeit bei Häufigkeit = 0,5 der Fit-Kurven) ergeben $v_{crit_1} \approx 575 \pm 40 \mu\text{m/s}$ für die Formumwandlungen des Diskozyts und $v_{crit_2} \approx 664 \pm 50 \mu\text{m/s}$ für die der Fallschirmform (vgl. Abbildung 26).

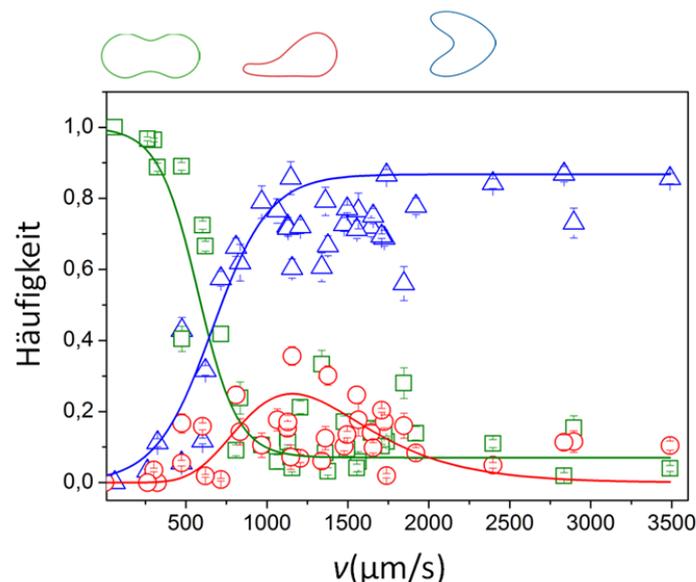


Abbildung 26: Verteilung der Häufigkeit P von Diskozyt (grüne Quadrate), Pantoffelform (rote Kreise), und Fallschirmform (blaue Dreiecke) abhängig von ihrer Fließgeschwindigkeit in der PDMS-Kapillare (Querschnitt $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$). Aus der Anpassung der Daten von Diskozyt (grüne Linie) und Fallschirmform (blaue Linie) an eine Boltzmann-Funktion erhält man zwei kritischen Geschwindigkeiten $v_{crit_1} = 575 \pm 40 \mu\text{m/s}$ aus der Abnahme der Diskozyten auf 0,5 und $v_{crit_2} = 664 \pm 50 \mu\text{m/s}$ aus der Zunahme der Fallschirmform auf 0,5. Die Häufigkeit der Pantoffelform ist gemäß Gl. 27 angepasst, mit einem Maximum bei etwa $1250 \pm 100 \mu\text{m/s}$ (rote Linie). Die Fehlerbalken geben die Genauigkeit der Stichprobe innerhalb des Konfidenzintervalls von 68% an. Jeder Datenpunkt beinhaltet die Analyse von mindestens zwanzig roten Blutkörperchen.

5.2.4 Experimentelles Phasendiagramm

Die Analyse der verschiedenen dynamischen Formen roter Blutkörperchen in den sich langsam verjüngenden Glaskapillaren ergibt in einer dreidimensionalen Auftragung eine Formenlandschaft, welche den Zusammenhang zwischen Häufigkeit der verschiedenen Formen, dem Kapillarradius und Flussgeschwindigkeit beschreibt. Diese Formenlandschaft kann als ein dynamisches Phasendiagramm verstanden werden und ist in Abbildung 27 dargestellt. Die Übergänge der verschiedenen Phasen (Formen) ineinander verlaufen kontinuierlich, als Grenzen der Gebiete für Diskozyten und Fallschirmform wurde eine mittlere Häufigkeit der Formen von 50% gewählt, was den jeweiligen kritischen Geschwindigkeiten entspricht. Entsprechend existieren Koexistenzgebiete für zwei oder alle drei beschriebenen dynamischen Formen, die in dem vereinfachten Phasendiagramm aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt sind. Die Häufigkeit der Pantoffelform ist in einem eigenem Diagramm dargestellt, hier wurden als Grenzen des Gebietes eine Häufigkeit von 20 % gewählt, denn insbesondere für Kapillardurchmesser größer als 8 μm wurden nur selten Häufigkeiten von 50 % oder mehr beobachtet. Nur für kleinere Kapillardurchmesser wurden Häufigkeiten der Pantoffelform über 50 % beobachtet (siehe Abbildung 27, vgl. auch Abschnitt 5.2.2).

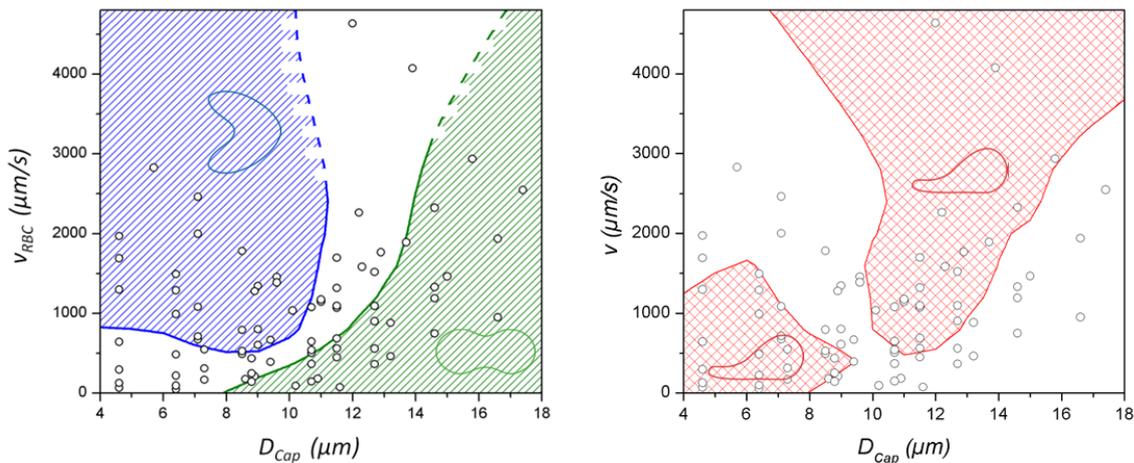


Abbildung 27 Links: Gebiete mit überwiegender Diskozyten (grün schraffiert) und Gebiete mit überwiegender Fallschirmformen (blau schraffiert). Die Linien entsprechen jeweils 50% Häufigkeit der Diskozyten (grün) bzw. Fallschirmform (blau) und entsprechen damit etwa den jeweiligen kritischen Geschwindigkeiten v_{crit_1} und v_{crit_2} . Bei Geschwindigkeiten über 2500 $\mu\text{m/s}$ sind nur noch wenige Messdaten vorhanden und die Extrapolation zwischen den Messpunkten (offene runde Kreise) ist hier weniger genau (gestrichelte Grenzlinien). **Rechts:** Das Gebiet, in dem die Pantoffelform mit einer Häufigkeit von 20-100% auftritt. Das Gebiet ist in zwei Bereiche untergliedert. Im Bereich kleiner Kapillarradien (unterhalb etwa 4,5 μm) beeinflussen Wandwechselwirkungen die die Umwandlung in die Fallschirmform und die Häufigkeit der Pantoffelform nimmt stark zu.

Im blau schraffierten Gebiet ist die Häufigkeit der Fallschirmform über 50% und im grün schraffierten Gebiet liegt die Häufigkeit der Diskozyten über 50%. Die begrenzenden, durchgezogenen

Linien entsprechen dem Verlauf der kritischen Geschwindigkeiten, die blaue entspricht also v_{crit_2} und die grüne v_{crit_1} . Die einzelnen Messpunkte sind als offene Kreise eingezeichnet, hier wurde jeweils die Verteilung abhängig vom Kapillardurchmesser D_{cap} und der Geschwindigkeit der Blutkörperchen v bestimmt. Für jeden dieser Messpunkte wurden zwischen 20 und 130 Zellen evaluiert. Die Phasenlandschaft ergibt sich aus der Interpolation über diese Messpunkte.

Aus der Formenlandschaft wird deutlich, dass Fallschirmformen vor allem im Bereich $v_{RBC} \geq 600 \mu\text{m/s}$ und $D_{cap} \leq 11 \mu\text{m}$ auftreten. Bei diesen Kapillardurchmessern ist die kritische Geschwindigkeit der Fallschirmform v_{crit_2} nahezu unabhängig vom Kapillarradius. Die Formumwandlung wird in erster Linie von der Flussgeschwindigkeit gesteuert. Bei größeren Kapillardurchmessern ($D_{cap} \geq 11 \mu\text{m}$) nimmt die Häufigkeit der Fallschirmform schnell ab. Etwa komplementär dazu verhält sich die Häufigkeit der Diskozyten. Für $D_{cap} > 10 \mu\text{m}$ nimmt mit zunehmender Geschwindigkeit deren Häufigkeit zu. Im Bereich dazwischen ist die Pantoffelform besonders häufig, wobei das Gebiet von mehr als 20 % Pantoffelformen in zwei Bereiche gegliedert ist. Im Bereich kleiner Kapillardurchmesser und bis zu einer Geschwindigkeit von etwa $600 \mu\text{m/s}$ ist die Pantoffelform besonders häufig und kann 90 % erreichen. Dieses Verhalten wurde auch im Abschnitt 5.2.2 in den zulaufenden, sich stark verengenden PDMS-Kanälen beobachtet.

Für hohe Geschwindigkeiten läuft die kritische Geschwindigkeit v_{crit_2} gegen unendlich für einen Kapillardurchmesser $D_{crit_2} \approx 10,5 \mu\text{m}$. Das heißt, auch durch eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit ändert sich hier die Häufigkeit der Pantoffelform nicht mehr. Eine Erklärung hierfür ist, dass durch die Viskosität des Systems die kraftabhängige Rate für die Formumwandlung nicht beliebig groß werden kann, sondern gegen einen konstanten Wert läuft. Bei sehr hohen Geschwindigkeiten ist die Grenze daher zu kleineren Kapillardurchmessern verschoben. Damit wird dieses Setup für hohe Geschwindigkeiten zunehmend ungeeignet für die Erstellung des dynamischen Phasendiagramms. Nicht zuletzt deshalb wurden hier nur wenige Messpunkte aufgenommen und der Verlauf der Grenzen wird ist entsprechend ungenauer.

Neben den häufigen, typischen Formen (Diskozyt, Pantoffelform und Fallschirmform) wurden deutlich seltener auch andere dynamische Formen roter Blutkörperchen beobachtet, solche die nicht in die drei Kategorien Diskozyt, Pantoffelform oder Fallschirmform passen. Die Häufigkeit dieser anderen Formen im Phasendiagramm ist in Abbildung 28 dargestellt. Der Durchmesser der gefüllten schwarzen Kreise entspricht dabei dem prozentualen Anteil der anderen Formen. Diese anderen Formen treten offensichtlich alternativ zu den Pantoffelformen auf, sie besitzen keine erkennbare Symmetrie (wie z.B. eine Spiegelebene bei den Pantoffelformen) und lassen sich am ehesten dadurch charakterisieren, dass zwei nicht spiegelsymmetrisch angeordnete Eindellungen zu sehen sind. Ähnliche Formen wurden für elastische Kapseln theoretisch im linearen Scherfluss als Knitter-Phänomene (*wrinkling*) von Membranen beschrieben [147].

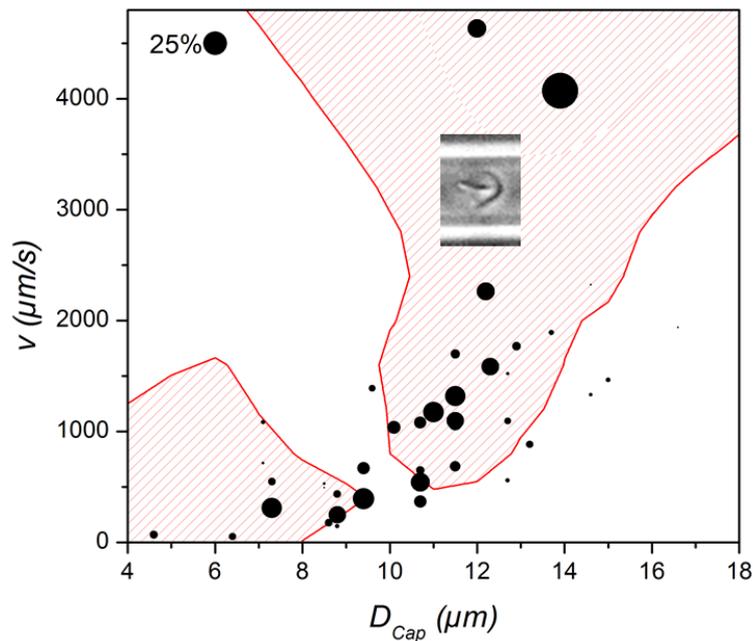


Abbildung 28: Auftreten anderer Formen roter Blutkörperchen (schwarze Punkte), wie z.B. das abgebildete Blutkörperchen. Das Auftreten dieser Formen ist dargestellt als gefüllte schwarze Kreise, deren Durchmesser dem prozentualen Anteil proportional ist. Sie treten häufig im Gebiet der Pantoffelform auf.

5.3 Das Poiseuille-Flussprofil als kritischer Parameter

Im Kapillarfluss wandern rote Blutkörperchen ebenso wie Vesikel entlang des Geschwindigkeitsgradienten des Poiseuille-Profiles hin zur Kapillarmitte, wo die Geschwindigkeit maximal ist. Da sowohl Vesikel als auch Blutkörperchen als elastische Schalen aufgefasst werden können, lassen sich beide in ihrem Verhalten gut vergleichen. Aufgrund der der wirkenden Kräfte, die sich anhand der parabelförmigen Krümmung des Poiseuille-Profiles veranschaulichen lassen, werden Blutkörperchen wie Vesikel in eine Fallschirm-ähnliche Form gezwungen, sobald sie sich im Zentrum der Kapillare befinden. Danker et al. zeigten in einer theoretischen Arbeit weiterhin, dass sich Vesikel nur dann stabil in der Mitte des Poiseuille-Profiles bewegen und Fallschirmformen annehmen, wenn die Krümmung des Flussprofils entsprechend den hydrodynamischen Kräften groß genug ist gegenüber der Biegesteifigkeit κ der Membran der Vesikel [131]. Für Vesikel ist das der Fall, wenn das dimensionslose Verhältnis aus den hydrodynamischen Kräfte und der Biegesteifigkeit der Membran

$$(\eta r^4 c) / \kappa$$

Gl. 30

größer wird als 10, mit der dynamischen Viskosität η der Umgebenden Flüssigkeit, dem Radius r der Vesikel und dem Parameter c , der die Charakteristika des Flussprofils beschreibt (vgl. Gl. 32) [99].

Entsprechend dieser Vorhersage für die Formänderung von Vesikel im Kapillarfluss lässt sich der Einfluss des äußeren Flussfeldes auf die Formänderung roter Blutkörperchen im Kapillarfluss untersuchen. Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille (Gl. 17) lässt sich der Verlauf der Geschwindigkeit (entsprechend der auf das Blutkörperchen wirkenden Kräfte) in einer Kapillare mit Radius R und der maximalen Geschwindigkeit v_0 berechnen:

$$v(r) = v_0 \left(1 - \left(\frac{r}{R}\right)^2\right) \quad \text{Gl. 31}$$

Für den Radius R lässt sich der Parameter c für die Geometrie des Flussprofils definieren als:

$$c \equiv \frac{d^2v(R)}{dR^2} = \frac{2v_0}{R^2} \quad \text{Gl. 32}$$

Der Parameter c dient damit als Maß für die Krümmung des Flussprofils und wird im Folgenden vereinfacht auch als Krümmung des Flussprofils bezeichnet. Das beschriebene Modell beschreibt also ein System, in welchem die Vesikel bzw. das Blutkörperchen nur die Krümmung des Flussprofils spüren und Wandwechselwirkungen vernachlässigt sind.

Damit ist es nun möglich, einen charakteristischen Wert $c = c^*$ für rote Blutkörperchen im Kapillarfluss zu bestimmen, bei dem die Formänderung auftritt. Betrachtet man zunächst den vereinfachten Fall, dass für den Radius des Blutkörperchens $r_{RBC} \ll R$ gilt, sowie die Geschwindigkeit $v_{RBC} \approx v_0$, ergibt sich eine kritische Geschwindigkeit $v_{RBC}^* = \frac{c^* R^2}{2}$. Diese Näherung ist genaugenommen nur gültig für ein sehr kleines Objekt und unter Vernachlässigung von Wandwechselwirkungen. Die Geschwindigkeit eines Objekts vergleichbar mit den untersuchten Blutkörperchen ist immer kleiner als die zentrale, maximale Geschwindigkeit des ungestörten Poiseuille Flusses, da Bereiche des Objekts in Bereiche geringerer Strömungsgeschwindigkeit ragen. Relativ zur maximalen Geschwindigkeit v_0 im ungestörten Fluss ist die tatsächliche Geschwindigkeit einer starren Kugel in solch einem Poiseuillefluss um die sogenannte Schlupfgeschwindigkeit (*slip velocity*) $v_s = -\frac{1}{3} c r_{RBC}^2$ verringert [131]. Nimmt man ein starres, kugelförmiges Blutkörperchen an, so lässt sich zusammen mit Gl. 32 dessen Geschwindigkeit näherungsweise aus v_0 und R der ungestörten Strömung berechnen:

$$v_{RBC} \approx v_0 - v_s = v_0 \left(1 - \frac{2}{3} \frac{r_{RBC}^2}{R^2}\right) \quad \text{Gl. 33}$$

Mit Gl. 32 lässt sich folgender theoretischer Zusammenhang für die kritische Geschwindigkeit herstellen:

$$v_{RBC}^* = \frac{c^* R^2}{2} \left(1 - \frac{2 r_{RBC}^2}{3 R^2} \right) \quad \text{Gl. 34}$$

Diese theoretische kritische Geschwindigkeit v_{RBC}^* lässt sich mit den experimentell ermittelten kritischen Geschwindigkeiten v_{crit_1} und v_{crit_2} vergleichen (s. Diskussion).

5.4 Diskussion

In den vorgestellten Experimenten wurde die Formumwandlung roter Blutkörperchen in Kapillaren für physiologisch relevante Kapillarflüsse in einem Bereich von $4 \mu\text{m} < D_{cap} < 18 \mu\text{m}$ und einem Geschwindigkeitsbereich $0 \mu\text{m/s} < v_{RBC} < 4800 \mu\text{m/s}$ untersucht. Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit theoretischen Arbeiten diskutiert, die Blutkörperchen und auch Vesikel betrachten. Weiterhin werden quantitative Zusammenhänge zwischen der Flussgeschwindigkeit roter Blutkörperchen, den Charakteristika des hydrodynamischen Flussprofils und der Formumwandlung roter Blutkörperchen anhand des experimentellen Phasendiagramms diskutiert. Weiterhin wird auf mögliche molekulare Mechanismen eingegangen, die für die Formumwandlung eine Rolle spielen.

5.4.1 Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit theoretischen Modellen

Der Formübergang roter Blutkörperchen im Kapillarfluss wurde von Noguchi et al. in einer mesoskopischen, dreidimensionalen Simulation im Zusammenhang mit den elastischen Eigenschaften der Membran untersucht [90]. Für einen festen Kapillarradius ($R_{RBC}/R_{cap} = 0.71 \mu\text{m}$ entsprechend $R_{cap} = 4,6 \mu\text{m}$) erhält Noguchi eine kritische Geschwindigkeit von $v_{RBC}^* = 200 \mu\text{m/s}$. Dieser Wert ist gut vergleichbar mit dem experimentellen Wert von $v_{crit_1} \approx 575 \pm 40 \mu\text{m/s}$ und $v_{crit_2} \approx 664 \pm 50 \mu\text{m/s}$ für die PDMS-Kapillare. Die etwas höheren experimentellen Werte lassen sich insbesondere mit dem etwas größeren Radius der PDMS-Kapillare (Querschnitt von $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) erklären. Aus den Ergebnissen der Simulation von Noguchi et al. zeigt sich ein klarer Zusammenhang zwischen elastischen Membraneigenschaften und kritischer Geschwindigkeit. Sowohl eine Änderung der Biegesteifigkeit κ als auch der Scherelastizität μ der Membran beeinflussen die kritische Geschwindigkeit nahezu linear (es gilt $v_{RBC}^* \sim \mu R^2 + \kappa$). Für die Formumwandlung der Blutkörperchen ist dabei der Einfluss der Biegesteifigkeit auf die kritische Geschwindigkeit stärker als der Einfluss der Scherelastizität. Da die elastischen Eigenschaften roter Blutkörperchen natürlicherweise deutlich streuen, lässt sich so auch die deutliche Streuung der

kritischen Geschwindigkeiten innerhalb der Blutkörperchenpopulation eines einzelnen Spenders und auch der von verschiedenen Spendern erklären [148], [149].

Im Unterschied zu den Experimenten ist in der Simulation von Noguchi et al. die Pantoffelform ein sehr kurzlebiger, reiner Übergangszustand. Die experimentellen Ergebnisse hingegen zeigen, dass die Pantoffelform in einem bestimmten Gebiet des Phasendiagramms stabil ist und kein reiner kurzlebiger Übergangszustand während der dynamischen Formumwandlung ist. Diese Ergebnisse sind mit denen der Simulation von Noguchi et al. nicht direkt erklärbar. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz ist, dass in der Simulation ein Hookesches Verhalten für das Zytoskelett und damit ein konstanter Wert für die Scherelastizität und die Biegesteifigkeit der Blutkörperchenmembran angenommen wurde. Es ist jedoch bekannt, dass das Schermodul der Membran nichtlineare Eigenschaften zeigt [65], [66], [72]. Eine Zunahme des Schermoduls mit zunehmender Geschwindigkeit im Kapillarfluss (entsprechend der wirkenden Scherkräfte) könnte eine Stabilisierung der Pantoffelform und seine verlängerte Lebensdauer erklären. Dieses und damit im Zusammenhang stehende Phänomene werden in Kapitel 8 weiter aufgegriffen und eingehender diskutiert.

Mit der Frage, ob pantoffelförmige Blutkörperchen bzw. Vesikel stabile Formen sind, beschäftigt sich eine theoretische Arbeit von Kaoui et al [99]. Hierbei wird in einer zweidimensionalen Simulation sowohl das Schermodul der Membran als auch die Begrenzung der Kapillare durch Wände völlig vernachlässigt. Das Modell entspricht damit einer fluiden Lipidvesikel in einem unbegrenzten Poiseuille-Fluss, als freie Parameter werden das reduzierte Volumen und die Flussgeschwindigkeit verwendet. Zu Beginn sind die Vesikel asymmetrisch im Fluss platziert und wandern entlang des Geschwindigkeitsgradienten zur Kanalmitte, wobei ihre Form von 2D-pantoffelförmig in 2D-fallschirmförmig übergeht. Für bestimmte reduzierte Volumina, die vergleichbar sind mit denen roter Blutkörperchen, werden asymmetrische, pantoffelförmige Vesikel als stabile Formen erhalten. Die Simulation zeigt weiterhin, dass die Pantoffelform in einem gewissen Parameterbereich stabilisiert ist, weil sie hier im Vergleich zur Fallschirmform eine verminderte Schlupfgeschwindigkeit besitzt. Die Schlupfgeschwindigkeit ist die Differenz aus der Geschwindigkeit des ungestörten Flusses (ohne Blutkörperchen) und der des Blutkörperchens (bzw. der Vesikel). Ursache für diese verminderte Schlupfgeschwindigkeit ist wahrscheinlich die Panzerkettenbewegung (*tank treading*) pantoffelförmiger Blutkörperchen. Dabei nimmt die Membran am äußeren Fluss teil und trägt so zu einer geringeren Dissipation bei [134]. Aus ihren Ergebnissen schlussfolgern Kaoui et al., dass der Übergang Pantoffelform-Fallschirmform eine superkritische Bifurkation im Phasendiagramm darstellt, welche das dynamische Analog zu einem Phasenübergang zweiter Ordnung (also einem kontinuierlichen Phasenübergang) darstellt. Dieser Ansatz liefert damit eine (eher makroskopische) Beschreibung für das Auftreten asymmetrischer Blutkörperchenformen im Kapillarfluss. Da hier ein System betrachtet wurde, das Biegeelastizität ohne Scherelastizität besitzt, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Biegesteifigkeit der Membran einen wichtigen Einfluss auf die Stabilität der Formen roter Blutkörperchen im Kapillarfluss hat.

5.4.2 Einfluss der hydrodynamischen Kräfte auf den Formübergang

Zusammen mit den experimentellen Ergebnissen lässt sich durch umformen von Gl. 35 ein Wert c^* bestimmen, welcher die Charakteristika der Poiseuille-Strömung beschreibt, bei der die Formumwandlung stattfindet:

$$c^* = 2 \cdot \frac{v_{RBC}^*}{R^2 - \frac{2}{3}r_{RBC}^2} \quad \text{Gl. 35}$$

Setzt man die experimentelle Werte aus dem $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ PDMS-Kanal $v_{crit.1} = 575 \mu\text{m}/\text{s}$ und $v_{crit.2} = 664 \mu\text{m}/\text{s}$ für v_{RBC}^* in die Formel (Gl. 35), ein ergibt sich $c^* = 52,9 (s \cdot \mu\text{m})^{-1}$ beziehungsweise $c^* = 61,1 (s \cdot \mu\text{m})^{-1}$. Dabei wurde für den Kapillarradius ein auf runde Kapillaren korrigierter Wert $R_{Cap} \approx 5,5 \mu\text{m}$ eingesetzt (Berechnung siehe Anhang). Weiterhin kann mit c^* eine dimensionslose Größe $(\eta r^4 c^*)/\kappa = 37,5$ bzw. $47,6$ (Gl. 30) bestimmt⁴ werden, die das Verhältnis der Kräfte des Poiseuilleprofils und der Membranbiegesteifigkeit beschreibt. Für Lipidvesikel wurde hierfür ein kritischer Wert von 10 vorhergesagt [131], was mit den ermittelten Werte für die roten Blutkörperchen gut vergleichbar ist. Die höheren Wert für Blutkörperchen können vermutlich auf den Einfluss des Zytoskeletts zurückgeführt werden.

Der Verlauf für beide Werte von c^* ist zusammen mit der experimentellen Phasenlandschaft aus den Messungen in der Glaskapillare in Abbildung 29 graphisch dargestellt. Für Geschwindigkeiten $\leq 1000 \mu\text{m}/\text{s}$ lässt sich das Auftreten der Pantoffelformen anhand der Charakteristika des Flussprofils gut vorhersagen (vgl. Abbildung 29). Beide kritische Krümmungen trennen die Bereiche von Diskozyten und Fallschirmformen. Dieser Zusammenhang dient damit eindeutig als sehr hilfreiches Kriterium für die Vorhersage der Formumwandlung. Insbesondere die Umwandlung von Diskozyt in Pantoffelform für Kapillardurchmesser von etwa $7 \mu\text{m} \leq D_{Cap} \leq 13,0 \mu\text{m}$ wird dadurch gut beschrieben. Das Flussprofil spielt offensichtlich für die Formumwandlung des Diskozyten in die Pantoffelform eine entscheidendere Rolle als für die Formumwandlung der Pantoffelform in die Fallschirmform.

Die Abweichung vom Modell bei größeren Radien lassen sich teilweise durch die Position der roten Blutkörperchen relativ zu Kanalmitte erklären. Im Experiment liegen die Blutkörperchen zunächst nahe dem Boden der Kapillare und steigen dann aufgrund der Liftkraft entlang des Geschwindigkeitsgradienten langsam in Richtung Mitte der Kapillare. Im Bereich größerer Kapillardurchmesser befinden sich die Blutkörperchen häufiger noch nicht in der Kapillarmitte was damit auch zur Folge hat, dass $v_{RBC} \approx v_0$ weniger gut erfüllt ist. Ein Blutkörperchen wird nur dann die rotationssymmetrische Fallschirmform annehmen wenn auch das umgebende Scherfeld diese Symmetrie besitzt [131].

⁴ mit der Viskosität von Wasser $\eta=0,001$ Pas, eine theoretischen Blutkörperchenradius von $3,5 \mu\text{m}$ und einer Biegesteifigkeit von $2 \cdot 10^{-19} \text{J}$

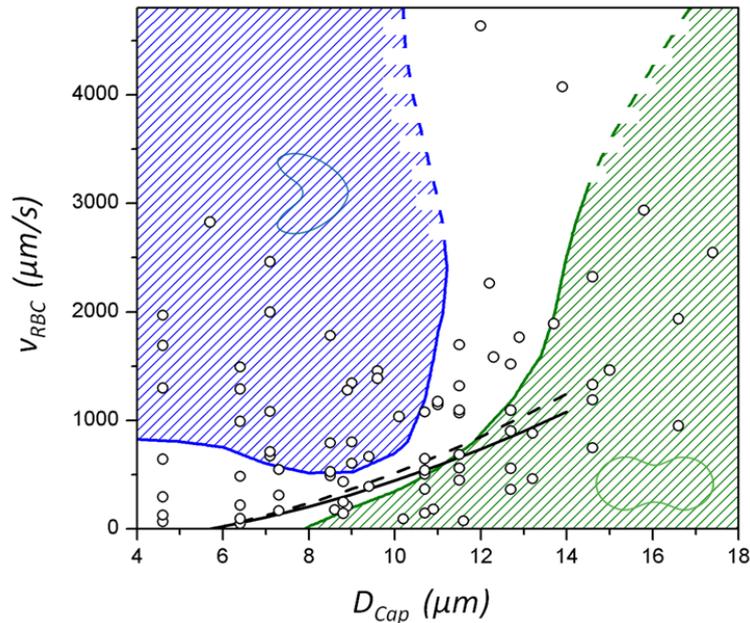


Abbildung 29: Experimentelle Formenlandschaft dynamischer Blutkörperchenformen. Gebiet der Diskozyten (grün) und der Fallschirmform (blau) sind die Bereiche, in dem die jeweilige Form zu mehr als 50 % auftritt. Die schwarzen Linien zeigen den Zusammenhang zwischen Krümmung des Poiseuille Profils und kritischer Geschwindigkeit im Vergleich mit den experimentellen Daten: durchgezogene schwarze Linie für $v_{crit,1} = 575 \mu\text{m/s}$ mit $c^* = 52,9 (s \cdot \mu\text{m})^{-1}$ und der gestrichelten schwarzen Linie für $v_{crit,2} = 664 \mu\text{m/s}$ mit $c^* = 61,1 (s \cdot \mu\text{m})^{-1}$. Abweichungen von diesem Zusammenhang werden im Text diskutiert. Die offenen Kreise stellen die Messpunkte dar, an denen die Verteilung der Formen bestimmt und über die die Formenlandschaft interpoliert wurde. Bei Geschwindigkeiten über $2500 \mu\text{m/s}$ sind nur wenige Messpunkte vorhanden, der Verlauf der Grenzlinien (gestrichelter Bereich) ist hier nur grob extrapoliert.

Bei kleinen Kapillardurchmessern ($D_{Cap} \leq D_{RBC}$) kommen geometrische Einschränkungen der Blutkörperchen und starke Wandwechselwirkungen ins Spiel. Das Blutkörperchen muss sich deformieren, um überhaupt in die Kapillare zu passen (vgl. Abbildung 30). Der Abstand zwischen Blutkörperchen und Wand bleibt damit quasi konstant. Der Formübergang wird hier allein durch die Geschwindigkeit bzw. durch die Scherkräfte (Reibung) zwischen der Kanalwand, wo $v = 0$ gilt, und dem Blutkörperchen mit $v = v_{RBC}$ bestimmt. Bei Wandabständen von unter $0,1 \mu\text{m}$ werden sehr schnell sehr hohe Scherraten (Reibungskräfte) erreicht, selbst bei sehr kleinen Geschwindigkeiten (unter $50 \mu\text{m/s}$). Die Blutkörperchen relaxieren schnell (vgl. Rate k_f , vgl. Abbildung 25) in die Pantoffelform bzw. in die Fallschirmform. Für hohe Scherraten nimmt die Ratenkonstante k_f aufgrund der viskosen Dämpfung der Reaktion einen konstanten Wert an und die Umwandlung läuft auch bei höherer Geschwindigkeit nicht mehr schneller ab. So ist in diesem Bereich $v_{crit,1} < 50 \mu\text{m/s}$ und $v_{crit,2} \approx 600 \mu\text{m/s}$ nahezu konstant. Bei kleinen Kapillardurchmessern wirkt sich vermutlich auch die Biegesteifigkeit der Blutkörperchen stärker auf die Formumwandlung aus. Besonders die Fallschirmform weist hier starke lokale Krümmungen am

hinteren Ende des Blutkörperchens auf. Die Membran muss für den Formübergang von Pantoffelform in die Fallschirmform stark gekrümmt und eine entsprechende Energiebarriere überwunden werden. Dieser Effekt ist eine mögliche Erklärung für die deutliche Verschiebung von v_{crit_2} hin zu höheren Geschwindigkeiten bei kleinen Kapillardurchmessern. Betrachtet man Fallschirmformen bei Kapillarradien kleiner $\sim 3,6 \mu\text{m}$, so nähert sich der Radius der Membrankrümmung im am stärksten gekrümmten hinteren Bereiche der kritischen Länge $\Lambda_{el} = \sqrt{\kappa_b/\mu} \approx 0,28 \text{ nm}$. Für Deformationen oberhalb dieser Längenskala dominieren die scher- bzw. dehnungselastischen Eigenschaften das Verhalten der Membran und unterhalb dominiert die Biegeelastizität (vergleiche Kapitel 4.4). Dies kann die Verschiebung von v_{crit_2} zu höheren Geschwindigkeiten erklären.

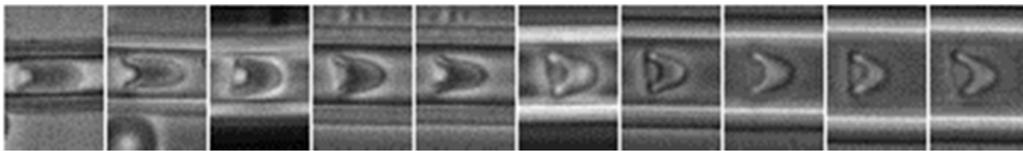


Abbildung 30. Fallschirmformen bei verschiedenen Kapillarradien, wenig oberhalb der kritischen Geschwindigkeit. In diesem Geschwindigkeitsbereich wird die Krümmung der Fallschirmformen hauptsächlich vom Kapillarradius bestimmt.

Bei hohen Geschwindigkeiten läuft insbesondere für die Fallschirmform die kritische Geschwindigkeit v_{crit_2} gegen unendlich für einen Kapillardurchmesser $D_{crit_2} \approx 10,5 \mu\text{m}$. Dies kann damit erklärt werden, dass die Blutkörperchen relativ zu ihrer Geschwindigkeit nicht schnell genug in ihre stabile, dynamische Form relaxieren. Aufgrund von Dissipation laufen die kraftabhängigen Raten, mit der die Formumwandlung abläuft, gegen einen konstanten Wert. In Folge dessen sind die Kapillardurchmesser für eine jeweilige kritische Geschwindigkeit zu kleineren Kapillardurchmessern verschoben. Die Blutkörperchen bewegen sich in den sich langsam verjüngenden Glaskapillaren so schnell, dass sie in der Zeit, bis sie in ihre neue dynamische Gleichgewichtsform relaxiert sind, bereits bei etwas kleineren Kapillarradien angekommen sind. Für Geschwindigkeiten über $3000 \mu\text{m/s}$ kann dieser Effekt eine Verschiebung um etwa einen $1 \mu\text{m}$ zu kleineren Kapillardurchmesser ausmachen.

In Phasendiagramm treten im Gebiet der Pantoffelformen auch weiter Übergangsformen auf, die wenige einheitliche charakteristische Merkmale zeigen. Diese Formen besitzen gewöhnlich keine Symmetrie, und weisen gefurchte oder längs geknickte Oberflächen auf (vgl. Abbildung 28). Ähnliche gefurchte Formen sind wurden in linearen Scherfeldern für elastische Kapseln in theoretischen Modellen erhalten [147]. Die Formen erinnern weiterhin an (durch den Kapillarfluss verzerrte) *Starfish*-Formen (Seestern-Formen), wie sie als Gleichgewichtsformen von Vesikel gefunden werden. Diese *Starfish*-Formen treten bei Parametern (insbesondere das Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis) auf die nur gering von denen für rote Blutkörperchen typischen abweichen [87] [150]. Da sie im Phasengebiet der Pantoffelform bei D_{Cap} größer $7 \mu\text{m}$ auftreten, wird hier

vermutet, dass es sich um alternative Zwischenformen für den Formübergang handelt, die bei einer geringen räumlicher Einschränkung, also einer großen Zahl an Freiheitsgraden, auftreten.

5.4.3 Molekulare Kontrollmechanismen der Formumwandlung

Es ist bekannt, dass sich Domänen des Spektrins unter Krafteinwirkung auffalten [70], [151]. Johnson et al. konnten auch an intakten Membranhüllen rote Blutkörperchen (Geisterzellen⁵) zeigen, dass sich im linearen Scherfluss helikale Linker-Regionen der Domänen des Spektrins ab einer Schubspannung von etwa $\sigma^* \approx 0,5 Pa$ zu entfalten beginnen [67]. In dieser Region nimmt auch die dynamische Bulk-Viskosität suspendierter Blutkörperchen ab (*Shear Thinning*) [137]. Nimmt man für die hier gezeigten Experimente im $10 \mu m \times 10 \mu m$ PDMS-Kanal einen mittleren Abstand zwischen Membran und Kanalwand von $1 \mu m$ an und für das umgebende Medium die Viskosität von Wasser, so ist diese kritische Schubspannung (Gl. 23) bei einer Geschwindigkeit der Blutkörperchen von $500 \mu m/s$ erreicht. Damit liegen hier die ermittelten kritischen Geschwindigkeiten und der Beginn der Entfaltung von Spektrindomänen in einem ähnlichen Bereich.

Es wurde gezeigt, dass die Bildung der Fallschirmform im Kapillarfluss nicht nur von der Bildung seines Vorläufers (der Pantoffelform) abhängt, sondern auch vom Durchmesser der Kapillare beeinflusst wird. Für eine reine Folgereaktionen $D \xrightarrow{a_1} P \xrightarrow{a_2} F$ lässt sich die Bildung des Endproduktes F aus den Raten a_1 und a_2 nach Gl. 26 berechnen. Besonders für kleine Kapillardurchmesser ist die Rate a_2 um einen konstanten Wert $v_0 \equiv v_{crit,2}$ stark verschoben, die Umwandlung in die Fallschirmform beginnt in unserem System erst bei höheren Geschwindigkeiten. Als Folge davon sammelt sich die Pantoffelform bei kleinen Kapillarradien an, sie ist in diesem Regime langlebiger.

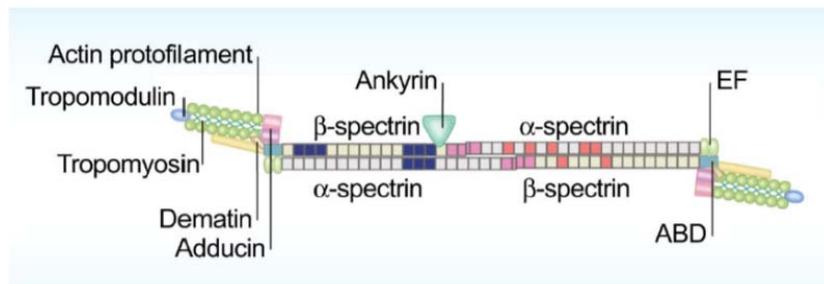


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Spektrins mit weiteren assoziierten Proteinen. Die verschiedenen Domänen des Spektrins sind schematisch als Quadrate dargestellt und besitzen unterschiedliche Funktionen [10]. In pink sind die Domänen dargestellt, an denen α - und β -Spektrin Kopf-an-Kopf miteinander verknüpft sind. Die hier rot dargestellten Domänen lassen sich leicht und damit spontan unterhalb von 37° entfalten. In blau sind hydrophobe Domänen dargestellt, die speziell mit Phosphatidylserin-Lipiden wechselwirken.

⁵ Geisterzellen sind in hypotonischem Puffer geplatze Blutkörperchen; ihre Membranen verschließen sich wieder spontan zu hämoglobinfreien Membranhüllen

Diskozyt, Pantoffelform und Fallschirmform treten als stabile, dynamische Formen im Kapillarfluss auf. Die Ergebnisse der hier gezeigten Messungen legen nahe, dass unterschiedliche molekulare Mechanismen die Deformierbarkeit und somit die Formumwandlung der roten Blutkörperchen im Kapillarfluss steuern. Es kommen verschiedene molekulare Kräfte in Frage, die bei der Formumwandlung überwunden werden müssen. Beispielsweise ist Spektrin über hydrophobe Wechselwirkungen einiger seiner Domänen mit der Plasmamembran an diese gebunden. Wird die Zelle deformiert, müssen solche (vergleichsweise schwachen) Bindungskräfte überwunden werden, um die Moleküle der Membran relativ zueinander zu bewegen oder zu verformen (vgl. Abbildung 31).

Weiterhin müssen für die Scherung des Zytoskeletts die Spektreine in die eine Richtung gestaucht und in die andere Richtung gestreckt werden, gegen ihre entropische Energie. Bei höheren Kräften werden Domänen im Spektrin entfaltet. Ebenso können Bindungen brechen womit sich die Maschendichte des Zytoskeletts ändert. Für eine nähere Erläuterung der Möglichen molekularen Mechanismen sei an dieser Stelle auf Kapitel 8 verwiesen, wo der Einfluss von chemischen Modifikationen der Zellmembran auf die Formumwandlung untersucht wird. Auch im Kapitel 7 findet sich bei der Untersuchung der Relaxation von der Fallschirmform in den Diskozyt ein zweistufiges Verhalten, das in ähnlicher Weise auf verschiedene molekulare Mechanismen zurückzuführen ist.

5.4.4 Physiologische Einordnung der Ergebnisse

Die Blutgefäße des Kapillarsystems sind im Gegensatz zu den hier verwendeten künstlichen Kapillaren mit einer Glykokalix ausgekleidet. *In vivo* Messungen und theoretische Arbeiten zeigen, dass diese den effektiven Kapillarradius um bis zu 3 μm verkleinert [152] [153]. Andererseits befinden sich im Blutsystem des menschlichen Körpers verschiedene Substanzen, wie zum Beispiel ATP, die die Blutkörperchen weicher und elastischer machen (vgl. hierzu auch Kapitel 7). *In vivo* wurden sowohl Pantoffelformen als auch Fallschirmformen im Kapillarfluss beobachtet [154]. Insgesamt lassen die Messungen die experimentellen Ergebnisse jedoch vermuten, dass bei typischen Geschwindigkeit in Kapillaren von etwa 200 $\mu\text{m/s}$ (ohne Belastung) die Zellen überwiegend als Pantoffelformen vorliegen [30]. mit Erst wenn bei Belastung die Flussgeschwindigkeiten zunehmen, wandeln sie sich vermehrt in die Fallschirmform um. Dies lässt vermuten, dass im physiologischem System die unsymmetrischen Formen eine wichtigere Rolle spielen als die symmetrische Fallschirmform. Zudem sind Adern nicht geradlinig und deutlich unregelmäßiger in ihrem Radius, auch das begünstigt unsymmetrische Formen. Dies wurde von Beobachtungen *in vivo* bei höheren Flussgeschwindigkeiten von etwa 1,5 mm/s gezeigt [154].

Eine interessanter Aspekt dabei ist, dass die Panzerkettenbewegung der Membran bei unsymmetrischen Formen die Durchmischung des Zytosols fördert. Dies erscheint umso nachvollziehbarer wenn man sich vor Augen hält, dass Blutkörperchen kein Mikrotubuli-basiertes Zytoskelett für einen aktiven Stofftransport besitzen, sondern gänzlich auf passiven Stofftransport angewiesen sind. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Fallschirmform und die Pantoffelform für die Effektivität der

Sauerstoffübertragung unterscheiden [155]. Beide Formen unterscheiden sich in ihrer Geometrie und Panzerkettenbewegung, was Einfluss hat auf den Diffusionsweg und die Durchmischung von Stoffen im Zytosol hat. Die breite statistische Verteilung der Übergangsgeschwindigkeit innerhalb einer Zellpopulation würde somit sicherstellen, dass Sauerstoffabgabe und Stoffaustauscher über die gesamte Länge einer Kapillare gleichmäßig erfolgt.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Häufigkeit der verschiedenen Formen roter Blutkörperchen im Kapillarfluss wurden sowohl zeit- als auch geschwindigkeitsabhängig (d.h. kraftabhängig) mit Ratengesetzen nach den Konzepten der statistischen Thermodynamik beschrieben. Es wurde ein dynamisches Phasendiagramm von roten Blutkörperchen im Kapillarfluss erstellt, wobei die Pantoffelform als eigenständige, stabile Form auftritt. Für große Kapillarradien, die eine geringe Wandwechselwirkung mit den Blutkörperchen bewirken, lässt sich das Auftreten der Pantoffelform mit einer kritischen Krümmung des Flussprofils korrelieren. Für kleinere Radien werden Wandwechselwirkungen dominant und der Formübergang zur Fallschirmform wird erschwert, die Pantoffelform wird hingegen stabilisiert. Die Formumwandlung nativer roter Blutkörperchen im Kapillarfluss lässt sich mechanisch im einfachsten Fall als Balance zwischen den elastischen Membraneigenschaften (Biegesteifigkeit und Schermodul) und den hydrodynamischen Kräften des strömenden Fluides verstehen. Dadurch lässt sich die Formumwandlung mit den Charakteristika des Poiseuille-Flussprofils korrelieren. Da die Pantoffelform als stabile Form auftritt, müssen allerdings mindestens zwei verschiedene molekulare Mechanismen, bzw. zwei verschiedene "Schwellen-Kräfte" angenommen werden, die den Formübergang vom Diskozyt zur Pantoffelform und von der Pantoffelform in die Fallschirmform kontrollieren. Diese molekularen Mechanismen werden in Kapitel 8 durch chemische Modifikationen des Zytoskeletts genauer untersucht und diskutiert.

6 Rote Blutkörperchen in Mikrokanälen oszillierender Breite

"Although techniques exist for the measurement of the static elastic properties of erythrocytes, the cells are continuously deformed in vivo, the stress varying within periods of a few seconds. Thus dynamic elastic behaviour is essential for their physiological function." Engelhardt, Gaub, Sackmann, 1984 [156]

6.1 Einleitung

Im vorherigen Kapitel wurde die Formumwandlung roter Blutkörperchen in gleichförmigen Kapillaren untersucht und das Auftreten der Pantoffelform und der Fallschirmform parametrisiert. In den verwendeten PDMS-Kapillaren mit konstantem Querschnitt sind die Kräfte, die auf die Blutkörperchen wirken, konstant. Auch in den sich langsam verengenden Glaskapillaren ändern sich die wirkenden Kräfte nur wenig und vergleichsweise langsam. Die roten Blutkörperchen haben ausreichend Zeit, um in die jeweilige Gleichgewichtsform zu relaxieren. In diesem Kapitel wird nun das Verhalten von einzelnen Blutkörperchen unter Bedingungen untersucht, in denen sich die angreifenden Scherkräfte deutlich schneller ändern. Hierfür werden Kapillaren mit einem sich periodisch ändernden Querschnitt verwendet, deren Breite sinusförmig moduliert ist. In diesem System lässt sich das Relaxationsverhalten der Blutkörperchen auf sehr schnellen Zeitskalen untersuchen. Da zusätzlich auch die mittlere Breite des Kanals abnimmt, werden die Blutkörperchen durch ihre Formumwandlung getrieben und das Verhalten der verschiedenen dynamischen Formen in dem oszillierenden Fluss kann an einzelnen Blutkörperchen studiert werden.

Das dynamische Verhalten der roten Blutkörperchen auf schnellen Zeitskalen ist charakteristisch für deren viskoelastische Eigenschaften [98], [156]. Da die viskoelastischen Eigenschaften roter Blutkörperchen in vielen Krankheiten wie z.B. Malaria, verschiedene Anämien, Diabetes mellitus und andere Stoffwechselkrankheiten, verändert sind, ist deren Erforschung nicht nur für die Biophysik sondern auch für die Medizin von besonderem Interesse [10], [27], [157], [158]. Auch hinsichtlich möglicher Anwendungen in neuen, handlicheren Geräten für die Diagnostik von Krankheiten ist die Erforschung der viskoelastischen Eigenschaften lebender Zellen von großer Bedeutung.

Zur Interpretation des dynamischen Verhalten der Blutkörperchen in den schnell oszillierenden Kapillarflüssen wird eine Arbeit von Noguchi et al. herangezogen, die das dynamische Verhalten von Vesikel in periodisch strukturierten Mikrokanälen theoretisch vorhersagt [138]. Dabei oszillieren die Vesikel abhängig von der Flussgeschwindigkeit und der Kanalgeometrie entweder um einen bestimmten Anstellwinkel oder aber die Länge und Breite der Vesikel oszillieren um einen bestimmten Wert. Für Vesikel konnten diese Vorhersagen zudem experimentell bestätigt werden

[92], [138]. Vesikel sind ebenso wie Blutkörperchen geschlossene elastische Schalen, allerdings besitzen die Vesikel kein Zytoskelett und damit keine Scherelastizität. Gerade deshalb ist der Vergleich zwischen dem elastischen Verhalten roter Blutkörperchen und Vesikel sehr aufschlussreich, denn Unterschiede im Verhalten erlauben wichtige Rückschlüsse auf die Rolle des Zytoskeletts im viskoelastischen Verhalten der Blutkörperchen.

Im Folgenden wird das dynamische Verhalten einzelner roter Blutkörperchen in laminaren, schnell oszillierenden Scherflüssen untersucht. Hierfür wurden rechteckigen PDMS-Kapillaren verwendet, deren Breite sinusförmig oszilliert. Der Fluss in den Kapillaren ist hydrostatisch getrieben und damit innerhalb eines Einzelerperiments konstant. Die Ergebnisse werden unter anderem im Zusammenhang mit Theorie und Experimente von Lipidvesikel diskutiert.

6.2 Experimente und Ergebnisse

Für die Charakterisierung der Dynamik roter Blutkörperchen im schnell oszillierenden Kapillarfluss wurden linear zulaufende PDMS-Mikrokanäle verwendet, deren Querschnitt zusätzlich sinusförmig moduliert ist (Abbildung 33).

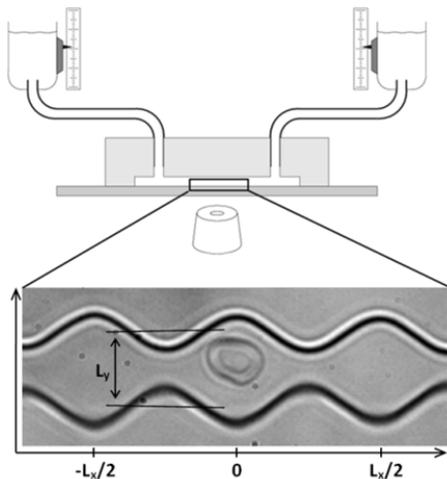


Abbildung 32: Darstellung des verwendeten Setups und oszillierende Geometrie des Mikrokanals mit mittlerer Breite L_y und Periodenlänge $L_x/2 = 21 \mu\text{m}$. Die Regulierung der Geschwindigkeit des Flusses erfolgt hydrostatisch über höhenverstellbare Flüssigkeits-Reservoirs, die am Ein- und Auslass des Mikrokanals angebracht sind.

Die Amplitude der Modulation beträgt in allen Experimenten $2,5 \mu\text{m}$ und die Periodenlänge $\frac{L_x}{2} = 21 \mu\text{m}$. Die mittlere Breite L_y des Kanals nimmt mit einer Steigung von $-0,0141$ ab, entsprechend nimmt die mittlere Flussgeschwindigkeit entlang L_x zu. Die Höhe des Kanals ist mit $8 \mu\text{m}$ im gesamten Kanal gleich. Der Abstand der Kanalwände beträgt $2,5 \mu\text{m}$ an der engsten Stelle (am letzten Bauch nach Position 0 im Kanal, vgl. Abbildung 33a). Diese Kanalgeometrie bietet den Vorteil, dass der Einfluss von Kanalbreite L_y zusammen mit der Flussgeschwindigkeit auf das Verhalten einzelner roter Blutkörperchen untersucht werden kann. Der Fluss in den Kapillaren ist hydrostatisch über ein Reservoir getrieben. Durch Änderung des hydrostatischen Drucks wurde der

Volumenfluss und damit die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare variiert. Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels Hochgeschwindigkeits-Videoanalyse.

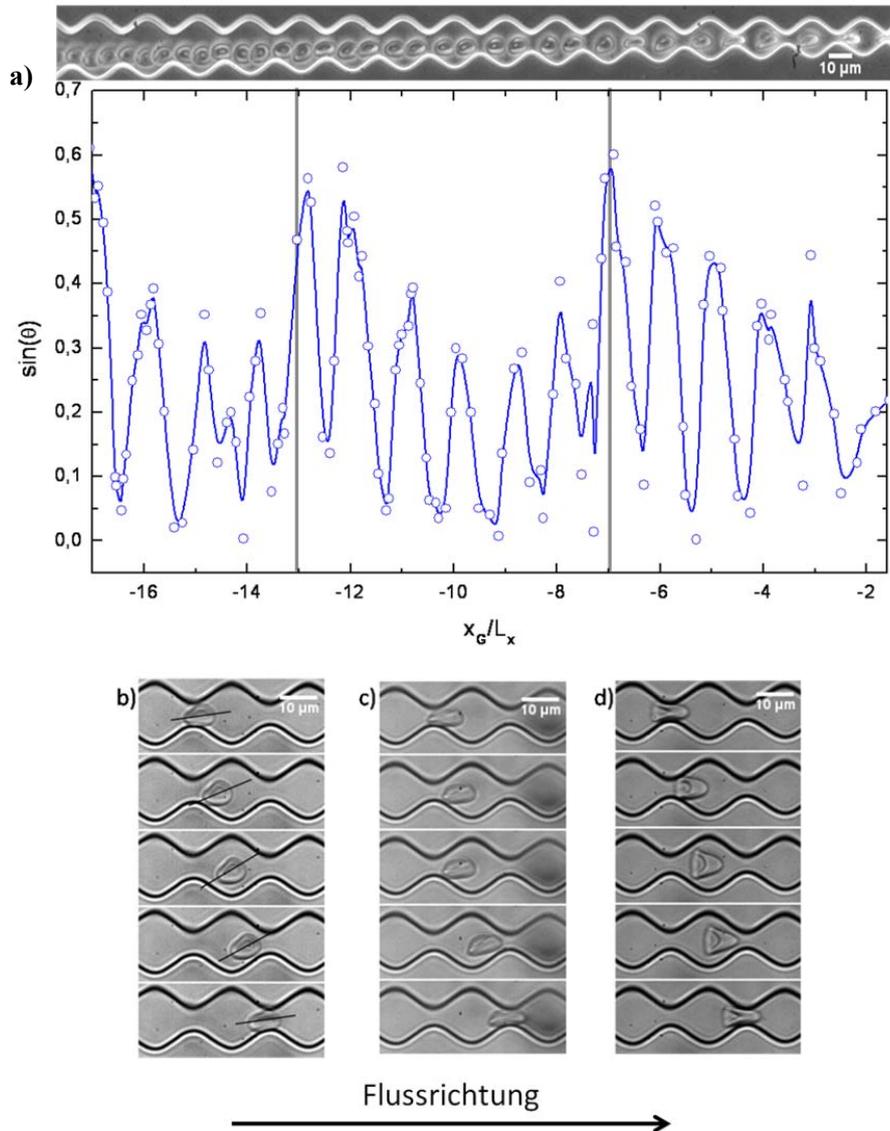


Abbildung 33: a) Amplitude der Winkeloszillation eines Blutkörperchens das erst seine Orientierung im Kanal (graue Linie bei $x_G/L_x = -11$) und dann seine Form vom Diskoid in die Pantoffelform ändert (graue Linie bei $x_G/L_x = -7$). Diese Änderungen sind mit einer Änderung der Amplitude korreliert. b) Der in den Experimenten verwendete, zulaufende PDMS-Mikrokanal mit sinusförmig modulierter Breite mit einem Diskoiden und c) einem Pantoffelförmigen roten Blutkörperchen, welche jeweils um einen festen Anstellwinkel oszillieren (Winkeloszillation). d) Fallschirmförmiges Blutkörperchen mit synchron zur Kanalgeometrie oszillierender Länge und Breite.

Bei großen Kanalbreiten L_y besitzen die analysierten Blutkörperchen eine eher ovale, diskoide Form und die um einen Anstellwinkel oszilliert. Mit abnehmender Kanalbreite und zunehmender Geschwindigkeit durchläuft die Zelle eine Formänderung von der diskoiden Form in eine Pantoffel Form und schließlich in die Fallschirmform, vergleichbar mit der in Kapitel 5 beschriebenen Formänderung in Kapillaren mit konstantem Querschnitt. In der Fallschirmform bewegen sich die Blutkörperchen mittig im Kanal. Statt der Oszillation um einen bestimmten Anstellwinkel tritt nun eine Formoszillation der Länge und Breite der Zelle auf. Anhand dieser drei verschiedenen charakteristischen Formen lässt sich das Flussverhalten der Blutkörperchen in den oszillierenden PDMS-Kanälen in drei Bereiche unterteilen (Abbildung 33 b-d).

Trägt man die Oszillation des Anstellwinkels eines Blutkörperchens im oszillierenden Fluss gegen seine Position im Kanal auf, lassen sich Änderungen der Amplitude mit einer Änderung der Orientierung oder der Form des Blutkörperchens korrelieren. Abbildung 33 a) zeigt ein rotes Blutkörperchen im Fluss durch den modulierten Kanal. Das anfangs noch diskoide Blutkörperchen liegt zunächst in der x-y Ebene, stellt sich im Bereich $\frac{x_G}{L_x} = -13$ seitlich auf und geht schließlich bei $\frac{x_G}{L_x} = -7$ in die Pantoffelform über.

Sowohl die Änderungen der Orientierung als auch die der Form sind mit einer deutlichen Änderung der Amplitude verbunden (graue Linien in Abbildung 33a). Die Amplituden nehmen zunächst kontinuierlich ab und nehmen dann nach erfolgter Orientierungs- oder Formänderung wieder sprunghaft zu. Die Winkeloszillation des Blutkörperchens ist offenbar mit einer Oszillation niedrigerer Frequenz moduliert, die die Amplitude jeweils bei einer Form bzw. Orientierungsänderung minimal werden lässt.

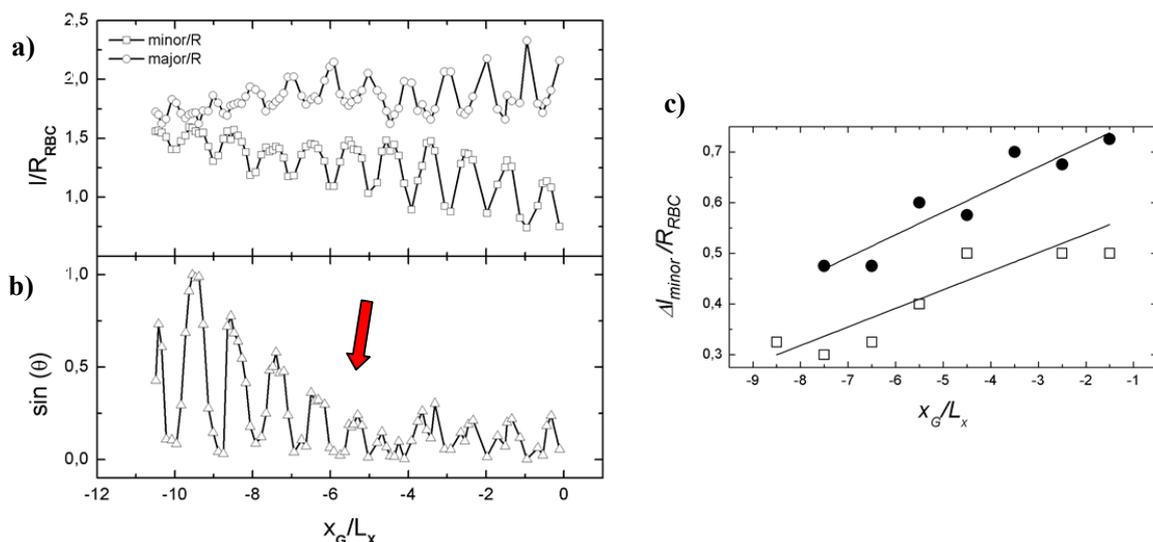


Abbildung 34: Oszillation der Form der auf normierten Länge l eines Blutkörperchens (a) und Oszillation des Anstellwinkels (b) aufgetragen gegen die Position im Kanal. Der Übergang von Pantoffel zu Fallschirmform ist mit einem roten Pfeil markiert. c) Mittlere Deformation zweier Blutkörperchen bei unterschiedlicher Geschwindigkeit.

Im Folgenden wird nun der Übergang von Winkel- zur Formoszillation näher analysiert. Die Änderung des Neigungswinkels und der Form eines roten Blutkörperchen im Fluss durch den oszillierenden Kanal ist in Abbildung 34 a) und b) graphisch dargestellt. Man erkennt deutlich, dass die Oszillation von Länge und Breite kontinuierlich mit kleinerem, mittleren Kanalquerschnitt L_y zunimmt. Die Oszillation des Anstellwinkels der Pantoffelform nimmt im Gegensatz dazu kontinuierlich ab. In der Fallschirmform ist die Winkeloszillation gleichbleibend um einen minimalen Wert. Die Formänderung von der Pantoffel- in die Fallschirmform ist durch einen roten Pfeil in Abbildung 34 b) markiert. Weiterhin ändert sich die relative Deformation der Blutkörperchen mit zunehmender Flussrate durch einen höheren hydrostatischen Druck. Vergleicht man die mittlere Deformation der Blutkörperchen abhängig von der Flussrate, so findet man bei identischer Kanalposition eine insgesamt stärkere Deformation der Blutkörperchen mit höherer Flussrate. In Abbildung 34 ist die mittlere Deformation der zweier Blutkörperchen in y-Richtung $\Delta l_{minor}/R_{RBC}$ bei unterschiedlichen Flussraten entlang ihrer Vorwärtsbewegung durch die Kapillare gezeigt.

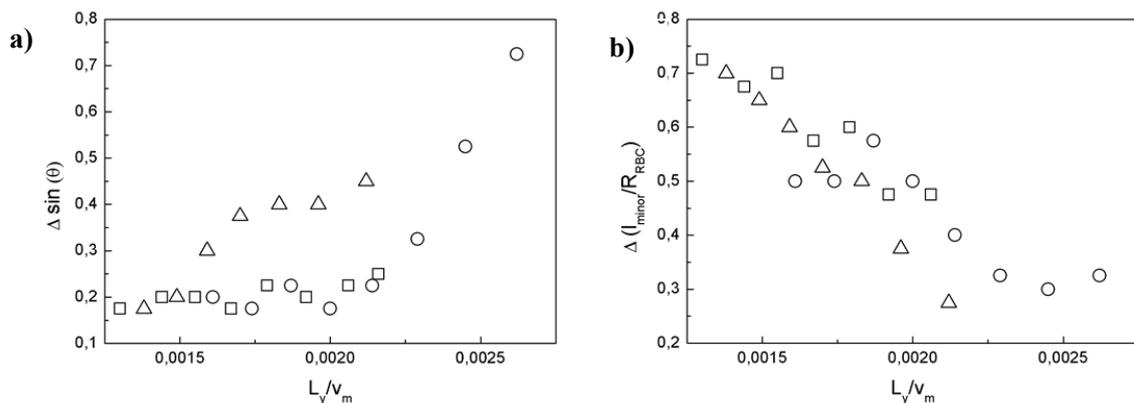


Abbildung 35: Abhängigkeit des Übergangs von Winkel- zur Formoszillation vom Quotient L_y/v_m für drei verschiedene rote Blutkörperchen. a) Unterhalb $L_y/v_m \approx 2,2 \cdot 10^{-3} s$ ist die Winkeloszillation auf einen konstanten minimalen Wert abgefallen. Im Gegensatz dazu besitzt die Formoszillation oberhalb dieses Wertes einen konstanten minimalen Wert.

Da der Übergang von Regime der Winkeloszillation in das Regime der Formoszillation mit der Formänderung korreliert, ist es vorteilhaft, diesen genauer zu charakterisieren. Der Übergang von Pantoffel- in Fallschirmform hängt sowohl von der Geschwindigkeit als auch von der Dimension des Kanals L_y ab und lässt sich durch L_y/v_m parametrisieren. In Abbildung 35 sind die Amplituden der Winkeloszillation aus drei verschiedenen Messungen gegen L_y/v_m geplottet. Oberhalb eines kritischen Wertes von $\frac{L_y}{v_m} > 2,2 \cdot 10^{-3} s$ lässt sich für drei verschiedene Zellen ein deutlicher Anstieg der Amplitude der Oszillation des Anstellwinkels erkennen. Die Amplituden der Formoszillation hingegen werden bei diesem Wert minimal. Der kritische Bereich $\frac{L_y}{v_m} \approx 2,2 \cdot 10^{-3} s$ markiert den Formübergang von der Pantoffelform zur Fallschirmform.

6.3 Diskussion

Die Untersuchung des dynamischen Verhaltens roter Blutkörperchen im Fluss durch Mikrokanäle mit oszillierender Breite hat gezeigt, dass die Blutkörperchen zwei dynamische Regime mit unterschiedlichem Resonanzverhalten zeigen. Bei niedriger Flussgeschwindigkeit v_m und großer mittlerer Kanalbreite L_y besitzen die Blutkörperchen eine näherungsweise ovale Form oder pantoffelförmige Form und oszillieren um einen festen Anstellwinkel synchron zur Kanalgeometrie. Nur die Bewegung der Blutkörperchen oszilliert also um einen mittleren Anstellwinkel, während ihre Form konstant bleibt.

Bei hoher Flussgeschwindigkeit und kleiner mittlerer Kanalbreite nehmen die Blutkörperchen eine Fallschirmform an und ihre Form selbst beginnt synchron zur Kanalgeometrie zu oszillieren. Bei großen Geschwindigkeiten ist der Übergang von Winkel zu Formübergang ebenso wie der Formübergang von Pantoffelform zur Fallschirmform zu größeren Kapillardurchmessern verschoben. Im Mittel fand der Übergang von Winkel- zu Formoszillation bei $\frac{L_y}{v_m} \approx 2,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}$ statt. Dieser Übergang entspricht qualitativ dem Übergang von der Pantoffelform zur rotationssymmetrischen Fallschirmform. Der Wert für den Übergang lässt sich in das Phasendiagramm für den Formübergang von Pantoffelform zur Fallschirmform einordnen, wie sie in Kapitel 5 ermittelt wurden. Vergleicht man diesen Wert für $\frac{L_y}{v_m}$ etwa mit dem entsprechenden Verhältnis $\frac{D_{Cap}}{v_{crit,2}}$ für ein vergleichbaren Kapillardurchmesser von $11 \mu\text{m}$ (Regime ohne Wandwechselwirkungen) so zeigt sich, dass $\frac{D_{Cap}}{v_{crit,2}} \approx \frac{11 \mu\text{m}}{3000 \mu\text{m/s}} \approx 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}$ etwa in derselben Größenordnung liegt. Für kleinere Kapillardurchmesser mit starken Wandwechselwirkungen liegt ein typischer Wert $\frac{D_{Cap}}{v_{crit,2}} \approx \frac{8 \mu\text{m}}{500 \mu\text{m/s}} = 0,016$ deutlich höher. Das Verhalten der Blutkörperchen in den hier verwendeten Kanälen mit oszillierender Breite entspricht also etwa dem von Blutkörperchen in Kapillaren mit $D_{Cap} > D_{RBC}$. Die kurzen Wandkontakte, welche die Blutkörperchen in den oszillierenden Kanälen erfahren, beeinflussen ihr Verhalten hinsichtlich der kritischen Geschwindigkeit für die Formumwandlung nicht maßgeblich. Mit der Änderung des Resonanzverhaltens der Blutkörperchen in den oszillierenden Kapillarflüssen erhält man damit einen gut messbaren Parameter, der die Formumwandlung der Blutkörperchen von Pantoffelform in Fallschirmform anzeigt.

Weiterhin ist auch die Änderung der Orientierung diskoider Blutkörperchen, also ihr mittlerer Anstellwinkel mit dem sich die Diskozyten durch den Kanal bewegen, durch eine Änderung ihres Oszillationsverhaltens charakterisiert. Und ebenso ist der Übergang von einer Diskoiden in die Pantoffelform mit der Änderung der Winkeloszillation korreliert. Beide Phänomene sind in Abbildung 33 c gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Schwingung um den Anstellwinkel mit einer weiteren Schwingung niedrigerer Frequenz moduliert ist, deren Minimum jeweils mit einer Änderung der Form oder der Orientierung des Blutkörperchens im Kanal korreliert. Diese Korrelation kann vermutlich auf das Formgedächtnis (und der damit verbundenen Anisotropie des Zytoskeletts) zurückgeführt werden, was sich auf die Panzerkettenbewegung des Zytoskeletts auswirkt [17],

[93]. Auch die Membran pantoffelförmige Blutkörperchen führt im Kapillarfluss eine Panzerkettenbewegung aus [134]. Eine mögliche Erklärung für die Modulation der Oszillation des Anstellwinkels ist daher, dass der Phasenwinkel φ des Zytoskeletts der Amplitude des Anstellwinkels überlagert ist und eine Form- oder Orientierungsänderung auch an die relative Position der Zytoskeletts geknüpft ist.

Lipidvesikel zeigen ein vergleichbares dynamisches Verhalten, wenn sie sich durch Mikrokanäle oszillierender Breite bewegen. Ebenso wie die Blutkörperchen oszillieren Vesikel im Fluss durch Zick-Zack-Kanäle abhängig von Geometrie und Flussgeschwindigkeit entweder in Länge und Breite oder um einen festen Anstellwinkel. Dieses Verhalten wurde im Rahmen einer Theorie zur Deformation von quasi-sphärischer Vesikel (Vesikel mit einem reduziertem Volumen $V^* \approx 1$) in schwach modulierten Mikrokanälen vorhergesagt und qualitativ erklärt [92], [138].

Qualitativ lässt sich dieses Verhalten verstehen, wenn man die Kräfte des hydrodynamischen Flusses einerseits und die Elastizität der Membran andererseits gegenüberstellt [90], [138]. Bei hoher Flussgeschwindigkeit kontrollieren die Kräfte der Fluidströmung das Verhalten der Vesikel, sie verformt sich entsprechend dem Kapillarfluss. Das Vesikel wird also in den Engstellen zusammengedrückt und sie expandiert in den weiten Stellen des Kanals. Länge und Breite der Vesikel oszillieren synchron zur Kanalgeometrie. Im Gegensatz dazu reichen bei niedriger Flussgeschwindigkeit die Kräfte der Strömung nicht aus, um die Vesikel zu verformen. Die Biegesteifigkeit der Lipidmembran kontrolliert das dynamische Verhalten. Da die Vesikel nicht verformt werden kann, reagiert sie auf das Flussfeld mit einer Oszillation um einen bestimmten mittleren Anstellwinkel (entweder $\pi/4$ oder $-\pi/4$), wiederum synchron zur Kanalgeometrie.

Dieser Zusammenhang wurde von Noguchi et al. eine theoretischer beschrieben [90], [138]. Er erhält aus dem Modell eine kritische, reduzierte Biegesteifigkeit κ^* als dimensionslosen Parameter, mit dem sich der Übergang zwischen Winkel- und Formoszillation beschreiben lässt. Die kritische reduzierte Biegesteifigkeit ist demnach

$$\kappa^* = \frac{\kappa L_y}{\eta R_V^3 v_m} = \frac{L_y}{v_m \tau} \quad \text{Gl. 36}$$

mit dem Radius der Vesikel R_V , der mittlere Kanalbreite L_y , die Viskosität η , die Fluidgeschwindigkeit v_m und $\tau = \eta R^3 / \kappa$ als charakteristische Relaxationszeit der Lipidvesikel. Im Regime der Winkeloszillation ist die reduzierte Biegesteifigkeit klein ($\kappa^* \ll 1$). Diese theoretischen Vorhersagen konnten für Lipidvesikel experimentell bestätigt werden [92], [138]. Für Vesikel liegt der Übergang zwischen beiden dynamischen Regimes bei $2.5 < \kappa^* < 10$. Dieses Konzept lässt sich auf das Verhalten der roten Blutkörperchen übertragen um entsprechende Werte von κ^* mit dem der Vesikel zu vergleichen. Mit $L_y / v_m \approx 2.2 \cdot 10^{-3} s$ und $\tau \approx \eta R^3 / \kappa \approx 0.1 \dots 1 s$ für rote Blutkörperchen ergibt sich ein deutlich geringerer Wert von $\kappa^* = 2.2 \cdot 10^{-3} \dots 2.2 \cdot 10^{-2}$. Diese Abweichungen zur Theorie der Vesikel sind nicht überraschend und bietet vielmehr Aufschlüsse über die Rolle des Zytoskeletts im dynamischen Verhalten der roten Blutkörperchen.

Die Abweichungen zwischen der Theorie der Vesikel und dem experimentellen Ergebnissen für rote Blutkörperchen ergeben sich zum Teil aus den leicht unterschiedlichen Parametern der beiden Systeme. Für die Theorie zur Deformation der Vesikel wurde ein deutlich höheres reduziertes Volumen $V^* \cong 1$ angesetzt als das der Blutkörperchen von $V^* \cong 0.6$. Weiterhin wurde für die Vesikel die innere Viskosität gleich der äußeren gesetzt, während die Viskosität im Inneren der Blutkörperchen etwa siebenmal höher ist als der sie umgebende PBS-Puffer. Zudem ist auch die Membranviskosität der Blutkörperchen deutlich höher als die der Vesikel. Kombiniert man beide Effekte, so erhöht sich die Viskosität für die Abschätzung der Relaxationszeit etwa um einen Faktor von 40 [17]. Damit erhöht sich die Scherrate, die notwendig ist um das Blutkörperchen zu verformen und die Werte von κ_c^* für Vesikel und Blutkörperchen nähern sich einander an.

Generell setzt die symmetrische Deformation der Blutkörperchen den Flusswiderstand im System herab, da hier die Störung des Strömungsfeldes minimal wird. Allerdings erhöht die symmetrische Deformation die freie Energie der Vesikel bzw. des Blutkörperchens. Für kleine Werte von κ^* überwiegt der Effekt der Erniedrigung des Flusswiderstandes und für große Werte von κ^* dominiert die freie Energie der Vesikel das Verhalten. Blutkörperchen besitzen im Gegensatz zu Vesikel nicht nur Biegeelastizität, sondern aufgrund ihres Zytoskeletts auch Scherelastizität, was den Betrag der freien Energie für die (symmetrische) Deformation zusätzlich erhöht und somit κ^* hin zu niedrigeren Werten verschiebt.

Unabhängig vom exakten Wert für κ^* zeigt die Theorie zur Deformation von Vesikel damit, dass im Regime der Winkeloszillation die Biegesteifigkeit (bzw. Biege- und Schersteifigkeit zusammen) des Objekts das Verhalten im Fluss bestimmt. Das Regime Winkeloszillation der Blutkörperchen liegt im Bereich der kritischen Geschwindigkeit des Formübergangs im Kapillarfluss (siehe Kapitel 5) und korreliert daher mit dem Auftreten der Pantoffelform. Die Ergebnisse der Experimente in den Kanälen oszillierender Breite zeigen also deutlich, dass die Pantoffelform von der Biegesteifigkeit der Membran kontrolliert wird. Der Formübergang in die Fallschirmform erfolgt erst, wenn die Scherkräfte der Strömung gegenüber der Biegesteifigkeit (bzw. Biege- und Schersteifigkeit zusammen) der Membran roter Blutkörperchen überwiegen. Das Modell von Noguchi et al. beschreibt weiterhin, dass sich die Amplituden der Formoszillation linear mit $1/L_y$ und mit zunehmender Flussrate zunehmen. Auch diese Vorhersage stimmt qualitativ mit dem Verhalten der roten Blutkörperchen überein (Abbildung 34).

Das komplexe, mikroskopische Verhalten der einzelnen roten Blutkörperchen bestimmt maßgeblich die makroskopischen rheologischen Eigenschaften des Blutes. Im linearen Scherfluss konnten Forsyth et al. beispielsweise zeigen, dass der Übergang vom taumelnden Bewegungs-Regime in das Regime der Panzerkettenbewegung der Membran mit einer Abnahme der effektiven Viskosität des Blutes und einer Zunahme der Ausschüttung von ATP verbunden ist [137]. Ein ähnlicher Effekt ist auch für Blut im Poiseuille-Fluss beim Übergang von der Pantoffelform zur Fallschirmform zu erwarten und verdeutlicht auch die mögliche physiologische Relevanz des komplexen dynamischen Verhaltens roter Blutkörperchen im Kapillarfluss. Die makroskopische Blutviskosität steht

in direkter Wechselbeziehung zu verschiedenen Krankheiten, wie zum Beispiel Bluthochdruck und den damit verbundenen Herz-Kreislauf Erkrankungen.

Das verwendete mikrofluidische Messprinzip hat sich als äußerst effektiv für die Analyse viskoelastischer Eigenschaften roter Blutkörperchen erwiesen und kann daher als Vorlage zur Entwicklung neuartiger diagnostischer Apparaturen, sogenannten Lab-on-a-Chip Systemen, dienen. Miniaturisierte mikrofluidischen Analysegeräten gewinnen zunehmend an Bedeutung für die medizinische Diagnostik, ihnen wird eine sehr bedeutende und erfolgversprechende Zukunft prophezeit [29], [159], [160].

7 Relaxation der Fallschirmform in die bikonkave Ruheform

"Cell deformation is an integral feature of biological function even for passive capsules like red blood cells in the circulation. Such deformation can cause major rearrangements of structural proteins and lipids and thereby affect biological activity." Discher, Mohandas, Evans, 1994 [69]

7.1 Einleitung

In den beiden vorangehenden Kapiteln wurde die Formumwandlung roter Blutkörperchen von der bikonkaven Ruheform in die Fallschirmform untersucht, wie sie mit zunehmender Geschwindigkeit im Kapillarfluss auftritt. Ebenso wurde das Relaxationsverhalten einzelner Blutkörperchen für vergleichsweise kleine Deformationen auf sehr schnellen Zeitskalen im Bereich von Millisekunden untersucht. In diesem Kapitel wird nun die vollständige Relaxation einzelner Blutkörperchen von der Fallschirmform in ihre bikonkave Gleichgewichtsform untersucht, indem die im Kapillarfluss beschleunigten Blutkörperchen plötzlich gestoppt werden. Dabei wird ein zweistufiger Relaxationsprozess beobachtet, bei dem die Fallschirmform erst in eine schüsselförmige (ähnlich einer Stomatozyte) Zwischenstufe relaxiert. In der zweiten Stufe beginnt die Position der Eindellung des Blutkörperchens sich zu verändern, die Zelle rotiert offensichtlich um ihre Längsachse. Der erste Prozess, die Formrelaxation, ist qualitativ vergleichbar mit der Formoszillation fallschirmförmiger Blutkörperchen, wie sie in Kapitel 6 beschrieben wurde. Die Formrelaxation ist entsprechend durch die Änderung des Längen und Breitenverhältnisses der Fallschirmform charakterisiert. Dieser Relaxationsschritt läuft hier auf einer Zeitskala von etwa 100 ms ab. Der zweite Prozess, die Rotationsrelaxation, dagegen ist mit Relaxationszeiten von wenigen Sekunden deutlich langsamer. Ein mit der Rotationsrelaxation vergleichbares Phänomen wurde von Fischer beschrieben, nachdem er roten Blutkörperchen in der Panzerkettenbewegung im linearen Scherfluss plötzlich stoppte [94]. Solch eine Rotationsbewegung der Membran der Blutkörperchen kann nicht durch die Lipidmembran, sondern nur durch das Formgedächtnis des Zytoskeletts sinnvoll erklärt werden. Das Formgedächtnis bewirkt, dass die Eindellung der Membran immer von derselben Membranregion gebildet wird. Nicht zuletzt daraus lässt sich erkennen, dass das Zytoskelett für das viskoelastische Verhalten der Blutkörperchen eine überaus wichtige Rolle spielt.

Die Messergebnisse der Formrelaxation sind mit denen anderen Methoden vergleichbar, die zur Charakterisierung der Eigenschaften der Membran roter Blutkörperchen beschrieben sind. Solche Methoden sind die Mikropipettenaspirationstechnik, die optische Pinzette oder das Rasterkraftmikroskop [14], [61], [62], [161], [162]. Diese Methoden ergeben Werte für das Schermodul μ im

Bereich von 4 bis $8 \cdot 10^{-6}$ N/m, mit entsprechenden Relaxationszeiten von wenigen 100 ms. Diese Literaturwerte variieren zum einen aufgrund der verschiedenen Arten, wie die Blutkörperchen deformiert wurden, und zum anderen, da die Proben unterschiedlich präpariert wurden. So wurden in einigen Messungen intakte Zellen verwendet, in anderen Messungen leere Zellhüllen (*Ghosts*) oder auch nur Fragmenten der Membran. Nichts desto trotz liefern diese Messungen wichtige Vergleichsgrößen für die hier durchgeführten Messungen. Ein zweistufiges Relaxationsverhalten wird bereits von Sackmann et al. berichtet [156]. Er erhält zwei verschiedene Werte für μ , indem er rote Blutkörperchen in hochfrequenten elektrischen Feldern deformiert. Er lieferte damit erste wertvolle Beweise für die komplexe molekulare Architektur des Zytoskeletts.

Es ist bekannt, dass verschiedene Mechanismen die mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts beeinflussen können. Die Elastizität des Blutkörperchens kann auch durch körpereigene Stoffe aktiv reguliert werden [77], [78], [89], [163]. Einer der bekanntesten dieser Regulatoren ist das ATP, das sowohl von Blutkörperchen selbst als auch von anderen Zellen als Botenstoff ausgeschüttet wird und so zur Regulierung des Blutdrucks beiträgt. ATP ist eine energiereiche Verbindung, die in zahlreichen energie-verbrauchenden, enzymatischen Prozessen des Körpers benötigt wird, um Phosphatgruppen auf andere Moleküle zu übertragen (Phosphorylierung). ATP wird durch Glykolyse ständig hergestellt bzw. recycelt.

Um den Einfluss ATP-abhängiger Prozesse im roten Blutkörperchen auf deren Relaxationsverhalten, und entsprechend auf deren Elastizität, genauer zu untersuchen, wurde ihr ATP-Gehalt in den hier durchgeführten Experimenten verändert. Der zelluläre ATP-Gehalt lässt sich einfach erniedrigen, indem den Blutkörperchen kein Brennstoff, wie z.B. Glucose, mehr zur Verfügung gestellt wird [164-166]. Die enzymatischen, ATP-abhängigen Prozesse in der Zelle kommen dann zum Erliegen, sie können aber durch Zugabe von ATP wieder aktiviert werden. In den hier durchgeführten Experimenten ließ sich weiterhin zeigen, dass bei einzelnen Zellen die Zeitskalen beider Prozesse der zweistufigen Relaxation miteinander gekoppelt sind. Ebenso konnten diese Zeitskalen durch Modifikation des Zytoskeletts über eine Änderung des ATP-Gehalts gezielt verändert werden. In ähnlicher Weise korreliert auch das Alter roter Blutkörperchen mit ATP-Gehalt und Elastizität [167].

7.2 Biochemische und mikroanatomische Grundlagen

7.2.1 Regulierung des Zytoskeletts durch Protein-Phosphorylierung

In den Experimenten konnten die Zeitskalen der Relaxationsprozesse und damit die elastischen Eigenschaften der Blutkörperchen durch eine Veränderung des ATP-Gehalts gezielt beeinflusst werden. Aufbauend auf der Beschreibung der molekularen Architektur aus Kapitel 2.2 werden hier die relevanten biochemischen Grundlagen zur ATP-abhängigen Regulierung des Zytoskeletts, die dessen Elastizität kontrollieren, näher erläutert.

Sowohl die Kopplung zwischen Plasmamembran und Zytoskelett als auch der Grad der Quervernetzung des Zytoskeletts (d.h. die Anzahl der Gitterdefekte durch gebrochene Spektrin-Aktin-Bindungen) ist enzymatisch durch die Phosphorylierung spezifischer Proteine gesteuert (vgl. Abbildung 36). Bei der Phosphorylierung wird eine Phosphatgruppe von einem Molekül ATP auf bestimmte Aminosäuren eines Proteins übertragen und kovalent gebunden. Dabei wird das energiereiche ATP in energieärmeres ADP umgewandelt und damit quasi "verbraucht", das Recycling von ADP zu ATP geschieht in der Glykolyse. Da jede Phosphatgruppe zwei negative Ladungen trägt, führt die Phosphorylierung eines Proteins in der Regel zu großen Änderungen der Konformation innerhalb eines Proteins. Die Funktionalität des Proteins verändert sich somit.

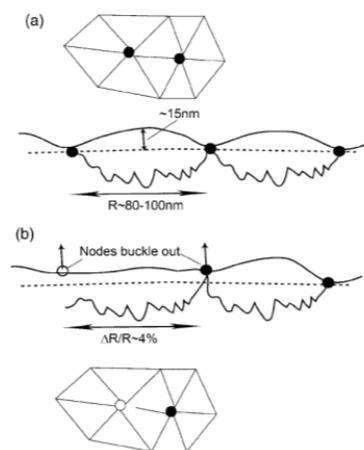


Abbildung 36: ATP-induzierte Mechanismen des Zytoskeletts [86]. Durch Phosphorylierung des Aktin-Bande 4.1-Spektrin Komplexes bricht ein Spektrin von einem Knotenpunkt des Netzwerkes ab. Dies führt auch dazu, dass sich die effektive Fläche des Zytoskeletts ändert. Weiterhin verringert sich das Schermodul des Zytoskeletts, da gebrochene Bindungen nicht zum Schermodul beitragen.

Die Zelle reguliert sämtliche wichtige Bestandteile des Zytoskeletts, darunter auch Aktin, Spektrin, Protein 4.1 und Protein 3, durch Phosphorylierung mit verschiedenen Kinasen [73], [74], [168]. Von Manno et al. wurde gezeigt, dass für die mechanischen Eigenschaften von roten Blutkörperchen besonders die Phosphorylierung von Bande 4.1 und von Spektrin selbst von großer Bedeutung ist [74]. Über Phosphorylierung von Protein 4.1 wird offensichtlich die Stabilität des ternären Komplexes aus Spektrin, Aktin und Protein 4.1 reguliert. Liegt Protein 4.1 in seinem phosphorylierten Zustand vor, so sind die Wechselwirkungen zwischen den drei Proteinen geschwächt und die Anzahl der (im zeitlichen Mittel) verknüpften Proteine des Netzwerkes ist vermindert. Ist Protein 4.1 nur gering phosphoryliert, so wird im Gegensatz dazu die Membran steifer [73]. Auch die Phosphorylierung von Spektrin führt zu einer verringerten Stabilität der Erythrozytenmembran [74]. Die Phosphorylierungen der Proteine sind reversibel, das Zytoskelett unterliegt einer ständige Dynamik aus aufbrechen und Wiederverknüpfung seiner Bindungsstellen. Im zeitlichen Mittel sind bei konstantem ATP Gehalt jedoch auch die Anzahl der kooperativen Wechselwirkungen und der Verknüpfungsgrad des Zytoskeletts konstant.

Das Zytoskelett reagiert auf Veränderungen des ATP-Gehalts nur langsam, auf Zeitskalen von vielen Minuten bis hin zu Stunden [166]. Sowohl der ATP Gehalt als auch die Aktivität ATP-

abhängiger Enzyme kann von Erythrozyt zu Erythrozyt stark variieren, die Ursache hierfür sind vermutlich Alterungseffekte [167].

Auch andere ATP-verbrauchende Prozesse, die nicht auf einer Phosphorylierung von Proteinen des Zytoskeletts beruhen, können zu einer verminderten Elastizität des Zytoskeletts führen. Vor kurzem wurde von Manno et al. berichtet, dass die hohe Konzentration von Phosphatidylserin-Lipiden auf der Innenseite der Plasmamembran Spektrin vor schädlichen Veränderungen durch Glukose schützt [169]. Phosphatidylserin bindet über hydrophobe Wechselwirkungen an die Oberfläche des Spektrin und kann so offensichtlich verhindern, dass Glukose die helikalen Domänen des Spektrins intramolekular Quervernetzt. Dieser Prozess läuft aber vermutlich über deutlich längere Zeitskalen (Stunden bzw. Tage) ab, als sie hier relevant sind. Zudem wurde den Blutkörperchen in den hier durchgeführten Experimenten mit vermindertem ATP-Gehalt keine Glukosequelle geboten. Deshalb kann man annehmen, dass dieser Prozess hier keine signifikante Rolle spielt.

In theoretischen und experimentellen Arbeiten wurde der Einfluss von ATP sowohl auf die Form roter Blutkörperchen in der Ruhelage, als auch auf elastische Eigenschaften untersucht [74], [75], [117], [166]. In einer theoretischen Arbeit haben Gov et al. ein Modell entwickelt, welches statische und dynamische Phänomene des Verhaltens roter Blutkörperchen durch die ATP-abhängige Regulierung des Zytoskeletts erklärt [86]. So kann die durch metabolische Auszehrung (Reduktion des ATP-Gehalts der Zelle) hervorgerufene Umwandlung vom Diskozyt in den Echinozyt durch eine hohe Vernetzung des Zytoskeletts erklärt werden. Denn bei geringem ATP-Gehalt und damit geringem Phosphorylierungsgrad von Protein 4.1 ist das Zytoskelett nahezu an allen möglichen Knotenpunkten verknüpft und es besitzt daher ein relativ hohes Schermodul. Anschaulich gesprochen zieht sich das Zytoskelett bei niedrigem ATP-Gehalt zusammen, seine Fläche verringert sich, während die der Plasmamembran unverändert bleibt. Allein dieser Effekt zieht eine Änderung der spontanen Krümmung (durch die Kopplung zwischen Zytoskelett und Plasmamembran) mit all seinen Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften nach sich (vergleiche hierzu Kapitel 2.3 und Kapitel 4) [64] [84], [89]. In einer vereinfachten Betrachtung erlaubt das Modell von Gov et al., die (scher-) elastischen Eigenschaften direkt mit dem ATP-Gehalt und ebenso mit dem Verknüpfungsgrad des Zytoskeletts in Zusammenhang zu stellen. Die Ergebnisse der Experimente werden unter anderem mit diesem Modell verglichen.

7.2.2 Bedeutung des Formgedächtnisses roter Blutkörperchen

Die bikonkave Ruheform der Blutkörperchen kann allein durch die Minimierung der Energie, die für die Biegung der Membran aufgebracht werden muss, erklärt werden. Damit allein lassen sich allerdings nicht alle Eigenschaften roter Blutkörperchen erklären. Als elastische Schalen aus einem polymerisierten Proteinnetzwerk besitzen rote Blutkörperchen als bemerkenswerte Eigenschaft ein Formgedächtnis. Kehrt ein Blutkörperchen nach einer Verformung wieder in seine Ruhelage zurück, werden Rand und Eindellung immer vom selben Bereich der Membran gebildet. Ursache

hierfür ist, dass verschiedene lokale Elemente des Zytoskeletts nicht identisch sind. Besonders deutlich wird dies bei der Panzerkettenbewegung im Scherfluss, hier laufen die Membranelemente der Eindellung zum Rand des Blutkörperchens und umgekehrt, während sich die Form der Zelle insgesamt nicht verändert (vgl. Abbildung 37). Bei diesem Verhalten sind die Membranelemente lokal verschieden stark verspannt und speichern daher die elastische Energie unterschiedlich. Sowohl lokale Verformung als auch Speicherung der Energie ändern sich periodisch mit π , nach einer Rotation um π erreichen sie wieder ihre Ausgangsform [93].

In diesem Zusammenhang kann man auch die von Fischer berichtete Rotations-Relaxation roter Blutkörperchen verstehen, die auf einer Zeitskala von einigen Sekunden abläuft [94]. Und ebenso kann man damit die hier beschriebene Rotationsrelaxation erklären. Die ursprüngliche Position der Eindellung ist auf molekularer Ebene im Zytoskelett des Blutkörperchens gespeichert und muss unweigerlich in seine ursprüngliche Position zurückkehren. Die quantitativen Zusammenhänge werden in der Diskussion der Ergebnisse erläutert.

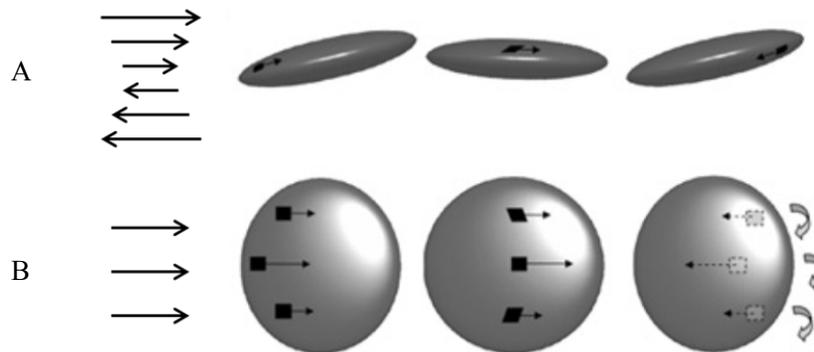


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Bewegung einzelner Membranelemente entlang der Oberfläche bei der Panzerkettenbewegung roter Blutkörperchen, Ansicht von der Seite (A) und von oben (B) [13].

7.3 Experimente und Ergebnisse

Zur Untersuchung der Relaxation von fallschirmförmigen Blutkörperchen in ihre bikonkave Ruheform wurden hyperbolisch zulaufenden PDMS-Kanäle verwendet welche in ein 100 μm breites Reservoir münden (Abbildung 38). Der Fluss in der Kapillare ist hydrostatisch über ein Flüssigkeitsreservoir getrieben, wobei die Geschwindigkeit der Blutkörperchen vor dem Austritt aus der Verengung (Querschnitt etwa 2,5 μm x 8 μm) über der kritischen Geschwindigkeit für die Formumwandlung in die Fallschirmform liegt. Die Geschwindigkeit beträgt kurz vor der Mündung etwa 300 $\mu\text{m}/\text{s}$ und sinkt im Reservoir abrupt auf unter 10 $\mu\text{m}/\text{s}$ ab, sodass die Blutkörperchen in ihre bikonkave Ruheform relaxieren (vergleiche auch Kapitel 5). Teilweise wurde der Fluss vollständig gestoppt, entweder weil echinozytische (und damit sehr steifere) Zellen die Verengung

blockierten, oder weil der hydrostatische Druck, der den Fluss antreibt, schnell auf null gesetzt wurde. In allen Fällen wurden keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der Blutkörperchen beobachtet.

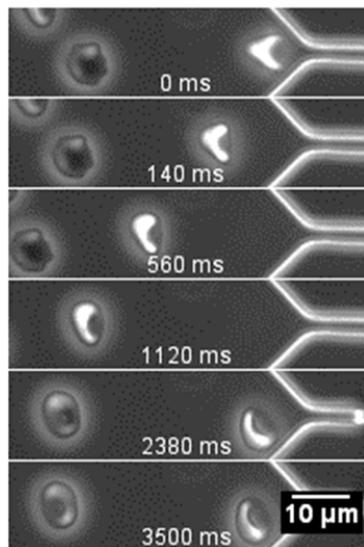


Abbildung 38: Relaxation eines roten Blutkörperchens von der Fallschirmform in seine bikonkave Ruheform. Innerhalb der weniger 100 ms ändert sich die Form des Fallschirms, er wird flacher und breiter. Im Beispielbild beginnt nach etwa 1000 ms die zweite Phase der Relaxation, in der sich die erst schräg nach rechts zeigende Eindellung nach links bewegt. Das Blutkörperchen rotiert scheinbar um die lange Achse seiner ovalen Silhouette.

Auswertung des zweistufigen Relaxationsverhaltens

In den Experimenten wurde eine zweistufige Relaxation von der Fallschirmform in den Diskozyten beobachtet. Für die erste Phase der Relaxation ist charakteristisch, dass sich Länge und Durchmesser (Breite) der Fallschirmform ändern. Das Blutkörperchen relaxiert von einer langen, schmalen Form in eine flache, breite Form, die an einen Stomatozyt erinnert. In zweidimensionalen Videoaufzeichnungen ist nicht eindeutig zu erkennen, ob und wann sich auf der abgewandten Seite bereits eine zweite Eindellung gebildet hat. Dieser ersten Phase der Relaxation (Formrelaxation) folgt, mit einem zeitlichen Abstand von wenigen Sekunden, eine zweite Relaxationsbewegung, die durch eine Rotation des Blutkörperchens gekennzeichnet ist. In dieser Phase bewegt sich die Eindellung über die Oberfläche, das Blutkörperchen rotiert praktisch um die Längsachse seiner ovalen Silhouette.

Beide Relaxationsphasen besitzen unterschiedliche, charakteristische Zeitskalen. Die Formrelaxation läuft auf einer Zeitskala um 100 ms ab, während die Rotationsrelaxation auf einer Zeitskala von einigen Sekunden abläuft. Ein typischer Verlauf der kompletten Relaxation von Fallschirmform in Diskozyt mit nacheinander ablaufender Form- und Rotationsrelaxation ist in Abbildung 38 gezeigt. Während die Formrelaxation bei allen Blutkörperchen beobachtet werden kann, ist die Rotationsrelaxation nicht in jedem Fall zu verfolgen, unter anderem weil sich die Blutkörperchen aus dem Beobachtungsfeld bewegen. Die Rotationsrelaxation wurde mit und gegen den Uhrzeigersinn beobachtet (siehe Abbildung 39).

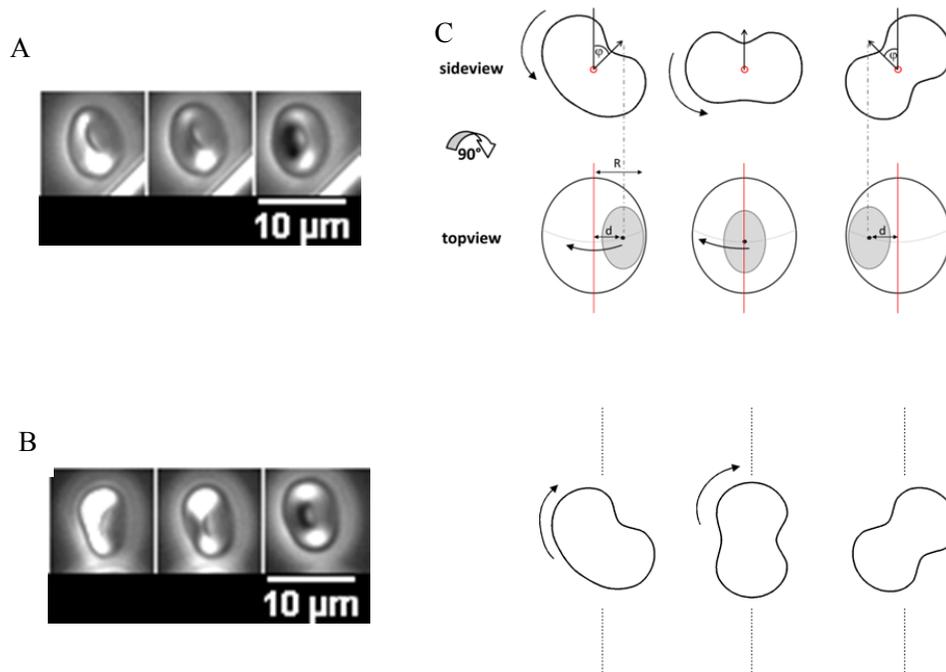


Abbildung 39 A und B: Die Rotationsrelaxation kann mit oder gegen den Uhrzeigersinn um die Längsachse des Blutkörperchens erfolgen. **C:** Die Skizze zum Ablauf der Rotationsrelaxation, die Ansicht der oberen Bildreihe ist um 90° nach oben gekippt. Die Rotationsrelaxation wird parametrisiert, indem die zeitliche Änderung des Winkels φ der Bewegung der Eindellung anhand der Sinusfunktion bestimmt wird.

Für die Formrelaxation ist die Änderung von Länge und Breite des Blutkörperchens charakteristisch. Trägt man die Änderung des Deformationsindex $DI = \text{Länge}/\text{Breite}$ gegen die Zeit auf, erhält man eine Relaxationszeit τ_1 aus dem Exponenten des exponentiellen Anpassung der Datenpunkte (Abbildung 40 A). Die mittlere Relaxationszeit der nativen Zellen beträgt $\tau_1 = 0,26s \pm 0,07s$.

Der zweite Relaxationsprozess, die Rotationsrelaxation, lässt sich parametrisieren, indem man die Bewegung der Eindellung über die Oberfläche erfasst (siehe Abbildung 40 B). Um den zeitlichen Verlauf der Rotationsrelaxation zu charakterisieren, wird ein Rotationswinkel φ definiert und gemäß $\sin\varphi = d/R$ bestimmt, wobei R der Radius des Blutkörperchens und d der Abstand der Mitte der Eindellung zur Mitte des Blutkörperchens ist (siehe Abbildung 39 C). Die Rotationsbewegung wurde sowohl in als auch gegen den Uhrzeigersinn beobachtet und läuft gewöhnlich durch null (vgl. Abbildung 40 B). Der Winkel φ läuft mit der Zeit gegen seinen Sättigungswert φ_∞ . Die Winkeländerung $\Delta\varphi = \varphi_0 - \varphi_\infty$ zwischen dem anfänglichen Wert φ_0 bei $t = 0$ und dem Sättigungswinkel variieren in einem Intervall von $0^\circ < \Delta\varphi < \pi/2$. Schon daraus ist ersichtlich, dass es sich bei dem beschriebenen Phänomen nicht um eine Taumelbewegung handelt, wie sie ab einer bestimmten (langsamen) Flussgeschwindigkeit für Blutkörperchen charakteristisch ist. Bei der Taumelbewegung ändert sich der Winkel monoton und fortlaufend.

Aus dem Kehrwert der Winkelgeschwindigkeit $d\phi/dt$ erhält man eine zweite Relaxationszeit $\tau_2 := \pi/4\omega$. Die Rotationsrelaxationszeit ist auf einen Winkel von 45° normiert, was dem Halb-Maximum der Rotationsbewegung entspricht (siehe Diskussion). Die experimentellen Werte von τ_2 liegen in einem Intervall von $9,6 \text{ s} < \tau_2 < 48,9 \text{ s}$, woraus sich eine mittlere Relaxationszeit $\tau_2 = 19,3 \text{ s} \pm 12,2 \text{ s}$ errechnet.

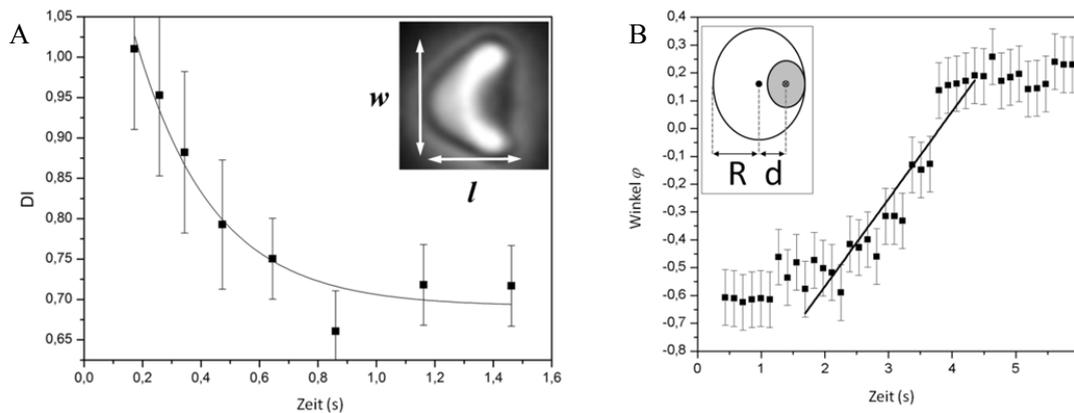


Abbildung 40 A: Die Relaxationszeit der ersten Phase der Relaxation erhält man, indem man die Änderung der Form (DI) gegen die Zeit aufträgt. Die Formrelaxation zeigt einen typischen exponentielle Verlauf, aus dem Exponent erhält man die entsprechende Relaxationszeit τ_1 . **B:** Die Rotationsrelaxation wird parametrisiert, indem die Wanderung der Eindellung als Rotationswinkel ϕ gegen die Zeit aufgetragen wird. Die Relaxationszeit τ_2 erhält man aus der Steigung.

Modifikation der Relaxationszeiten durch ATP

Die elastischen Eigenschaften von Blutkörperchen werden durch ihren ATP-Gehalt beeinflusst, denn der ATP-Gehalt der Zelle kontrolliert die Anzahl nicht-kovalenter Proteinbindungen im Zytoskelett. Daraus lassen sich in aus den Ergebnissen weitere Erkenntnisse für die Rolle des Zytoskeletts in beiden Relaxationsprozessen gewinnen. Der ATP-Gehalt wurde durch Auszehrung des Stoffwechsels gesenkt, indem die Zellen in PBS-Puffer, der keine Energie-Quelle zur Regeneration von ATP enthält, im Kühlschrank bis zur Verwendung (bis zu vier Tage) aufbewahrt wurden. Rote Blutkörperchen mit erhöhtem ATP-Spiegel wurden erhalten, indem dem PBS-Puffer Mg-ATP zugesetzt wurde (2 mM ATP und 2 mM MgCl_2). Das Auftreten echinozytischer Zellen korreliert mit dem mittlere ATP-Gehalt der Population der Blutkörperchen [170]. Dieser Zusammenhang wurde ausgenutzt, um das Relaxationsverhalten mit dem ungefähren ATP-Gehalt der Zellen zu korrelieren. Nach 48 Stunden metabolischer Auszehrung sind etwa 20% der Blutkörperchen echinozytisch und nach 72 Stunden etwa 30%, was einer Abnahme des ATP-Gehalts um etwa 70-80% entspricht [86], [170]. Der ATP-Gehalt von nativen Blutkörperchen liegt etwa bei $1,3 \text{ mM} \pm 0,3 \text{ mM}$.

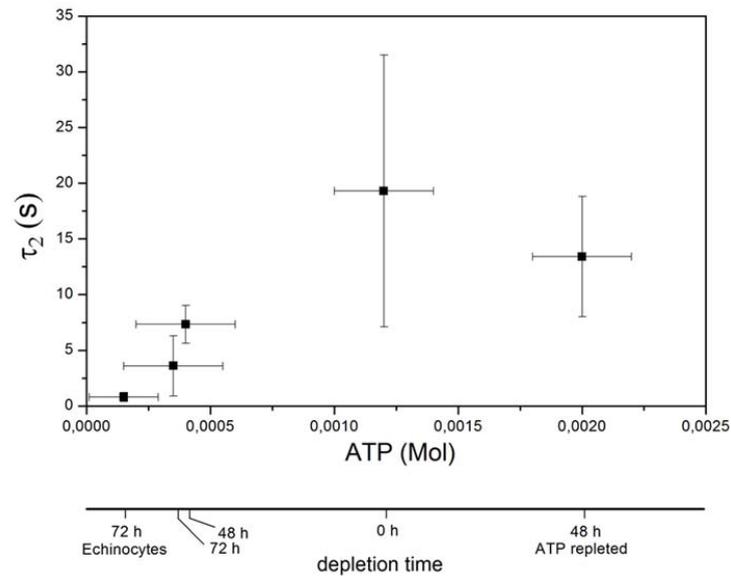


Abbildung 41: Relaxationszeit τ_2 in Abhängigkeit vom ATP-Gehalt der Zellen. Die starke Streuung der Werte ist auf natürliche Schwankungen der Enzymaktivität roter Blutkörperchen zurückzuführen (siehe Text). Unten ist die Zeitleiste Aufgetragen, aus der man entnehmen kann, wie lange die Zellen im entsprechenden Puffer inkubiert wurden.

Die Änderung des ATP-Gehalts der Zelle wirkte sich in den Experimenten deutlich auf die Zeitskalen der Rotationsrelaxation aus. Blutkörperchen mit erniedrigtem ATP-Gehalt zeigen deutlich kürzere Relaxationszeiten, wobei dieser Effekt durch Zugabe von ATP weitestgehend reversibel ist. Die Ergebnisse für τ_2 aus den Messungen mit verändertem ATP-Gehalt sind in Abbildung 41 dargestellt. Für die Auswertung wurden nur bikonkave Zellen berücksichtigt (Diskozyten und geringfügig echinozytische Zellen) und es wurde eine mittlere Relaxationszeit $\tau_2 = 7,3s \pm 1,7s$ für die 48 Stunden inkubierten Zellen und $\tau_2 = 3,6s \pm 2,7s$ für die 72 Stunden inkubierten Zellen gefunden. Diese Werte sind damit signifikant kleiner als die für native Zellen mit einem höheren ATP-Gehalt. Wurden die Zellen nach der 48-stündigen Auszehrung wieder mit ATP-haltigem Puffer (2 mM) inkubiert, so erhöhten sich die mittleren Zeitkonstanten für die Rotationsrelaxation wieder auf $\tau_2 = 13,4s \pm 5,4s$ und liegen damit etwa im Bereich nativer Blutkörperchen.

Die Werte beider Relaxationszeiten τ_1 und τ_2 streuen stark für verschiedene Blutkörperchen, nicht zuletzt aufgrund natürlicher Schwankung innerhalb einer Zellpopulation. Dennoch lassen sich die Werte für einzelne Zellen miteinander korrelieren. Vergleicht man die Werte für τ_1 und τ_2 einzelner Blutkörperchen, ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Dies ist in Abbildung 42 gezeigt, es sind Werte nativer und gealterter Zellen im Diagramm enthalten. Blutkörperchen mit schneller Formrelaxation weisen damit eine schnelle Rotationsrelaxation auf. Der lineare Fit der Datenpunkte verläuft nahezu durch den Ursprung und ergibt eine Steigung von $m = 38,5 \pm 4,8$. Beide Phasen der Relaxation sind offensichtlich miteinander korreliert. Diese Beobachtung lässt die logische Schlussfolgerung zu, dass beide Relaxationszeiten durch dieselben biochemischen oder

biophysikalischen Prozesse in der Zelle gesteuert werden. Hierauf wird in der Diskussion der Ergebnisse noch näher eingegangen.

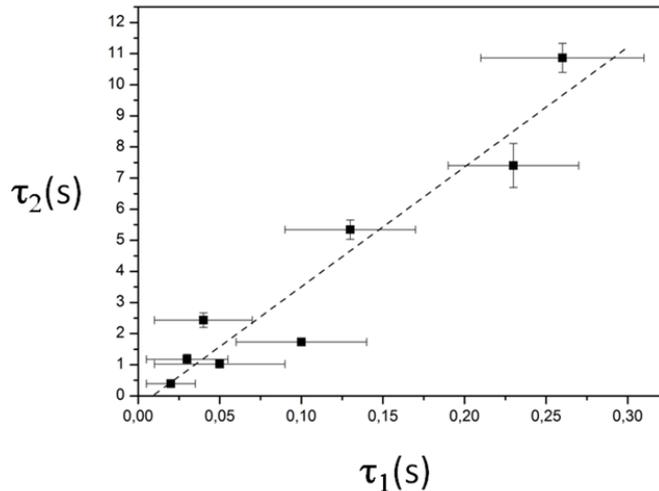


Abbildung 42: Die Relaxationszeiten τ_1 und τ_2 aus Form- und Rotationsrelaxation sind für einzelne Blutkörperchen näherungsweise linear miteinander korreliert.

7.4 Diskussion

An roten Blutkörperchen, die aus der Fallschirmform in ihre diskozytische Ruheform relaxieren, wurden zwei verschiedene Relaxationen beobachtet, die nacheinander auf zwei deutlich getrennten Zeitskalen ablaufen. In der ersten Stufe der Relaxation ändert sich zunächst das Verhältnis von Länge und Breite der Fallschirmformen und das Blutkörperchen geht in eine napfförmige oder stomatozytische Form über. In der zweiten Stufe der Relaxation wandert die Eindellung über die Oberfläche und in einer Rotationsbewegung bildet sich gleichzeitig die zweite Eindellung.

7.4.1 Zweistufige Relaxation

Erstmals berichteten Sackmann et al. von einem zweistufigen Relaxationsverhalten roter Blutkörperchen [156]. Nach der Deformation in hochfrequenten elektrischen Feldern ergaben sich aus dem Relaxationsverlauf Fitkurven mit zwei Exponenten und entsprechend zwei Relaxationszeiten von 0,1s und 1,0 s. Als Erklärung dient hierin ein lineares Voigt-Maxwell Modell mit zwei elastischen Elementen und zwei dämpfenden Elementen, die der Elastizität der Lipidschicht und des Zytoskeletts sowie der Membranviskosität und der Viskosität des Zytosols zugeordnet werden. Auch Lerche et al. berichten von zwei Zeitskalen im Bereich von einigen zehntel Sekunden und mehreren Sekunden für das Relaxationsverhalten bei Ansaugexperimenten mit der Mikropipette

[76]. Als Erklärung dienen in diesem Fall zwei mechanische Membran-Modelle. Das eine verbietet, dass sich die einzelnen Einheiten des Proteinnetzes relativ zur Plasmamembran bewegen und reorganisieren können (*MIB: Model of Immersed Boundaries*). Das andere Model hingegen erfasst, dass das Zytoskelett nur an bestimmten Stellen in der Lipiddoppelschicht verankert ist. Unter bestimmten Bedingungen können sich diese Ankerpunkte, und damit das Zytoskelett, relativ zur Lipidschicht bewegen, woraus sich eine Neu-Organisation des Zytoskeletts ergibt (*MFB: Model of Free Boundaries*). Hiernach spiegelt das erste Model (MIB) die mechanischen Membran-Eigenschaften gemäß der Theorie von Evans wieder und ist für kleine Formänderungen gültig. Bei großen Formänderungen "lockern" sich die Verankerungspunkte oder reißen gänzlich ab und das zweite Model (MFB) wird gültig.

Die Relaxationszeit der für den Übergang von der Fallschirmform in eine stomatozytische Form mit $\tau_1 = 0,30s \pm 0,20s$ ist in derselben Größenordnung wie die Relaxationszeiten die aus Experimenten mit Mikropipetten, der Pionier-Methode zur Untersuchung des viskoelastischen Verhaltens von Blutkörperchen, und optischen Pinzetten (*optical Tweezer*) erhalten werden [14], [61], [62], [161], [162]. Daher orientiert sich die Diskussion dieses Relaxationsprozesses nahe an diesen Arbeiten. Die Diskussion der Rotationsrelaxation erfolgt dann im Zusammenhang mit der Arbeit von Fischer [94], der als erstes eine ähnliche Rotationsbewegung roter Blutkörperchen nach einer Deformation im linearen Scherfeld beschrieben hat.

Formrelaxation τ_1

In der Fallschirmform sind bestimmte Bereiche der Membran stark gekrümmt, nämlich die Front und das besonders konkave Heck des Blutkörperchens. Zudem verursacht eine Änderung der Gausschen Krümmung in einer Region der Membran eine Änderung in der Scherdeformation des Zytoskeletts. Dadurch ist eine hohe elastische Energie in der Membran gespeichert und im Relaxationsprozess geht das Blutkörperchen zunächst von der eher länglichen (monokonkaven) Fallschirmform in eine (ebenfalls monokonkave) stomatozytische Form über. Der elastischen Relaxation wirkt eine Dissipation aufgrund der Viskosität der Zellmembran η_m und der Viskosität der umgebenden Flüssigkeit η entgegen. Aus dem Verhältnis von Biegedeformation mit entsprechender Biegesteifigkeit κ und der viskosen Dissipation ergibt sich nach Evans folgende Gleichung, aus der sich eine typische Relaxationszeit für rote Blutkörperchen ableitet [61]:

$$\tau_b = \frac{\nu + \eta R/c^2}{\kappa} \quad \text{Gl. 37}$$

wobei R der Radius eines Blutkörperchens ist und c die Krümmung am Heck der Fallschirmform. Der Beitrag der Membran zur Dissipation aufgrund der Biegung ist im Parameter ν enthalten. Dieser ist sehr gering und kann daher vernachlässigt werden. Mit den typischen Werten $R = \frac{1}{c} = 3,3\mu m$, $\kappa = 2 \cdot 10^{-19} J$ und $\eta = 10^{-3} Pa \cdot s$ erhält man als Größenordnung für die Relaxationszeit aus einer Biegung der Membran $\tau = 180 ms$. In Experimenten, in welchen rote

Blutkörperchen in eine Mikropipette eingesaugt und wieder ausgestoßen wurden, wurde eine entsprechende Relaxationszeit von $\sim 0,3s$ gemessen [61].

Analog kann eine charakteristische Relaxationszeit aufgrund der Scherung der Membran abgeschätzt werden.

$$\tau_s = \frac{\eta_m + \eta R}{\mu} \approx \frac{\eta_m}{\mu} \quad \text{Gl. 38}$$

Auch wurde bereits anhand von Experimente mit der Mikropipette gezeigt, dass die Membranviskosität η_m den dominierenden Einfluss auf die Relaxationszeit hat. Die Viskosität η der Umgebenden Flüssigkeit ist um zwei Größenordnungen kleiner und daher vernachlässigbar [61]. Mit einem typischen Wert für das Schermodul $\mu = 6 \cdot 10^{-6} N/m$ der Membran und der Membranviskosität $\eta_m = 10^{-6} Ns/m$ [63] erhält man für $\tau_s = 125 ms$, was wiederum in der selben Größenordnung liegt, wie die hier gemessene Relaxationszeit τ_1 .

Da sowohl die Abschätzung aus der Biegeelastizität als auch die aus der Scherelastizität Relaxationszeiten der gleichen Größenordnung ergeben, stellt sich die Frage, welcher Beitrag zur Elastischen Energie nun dominiert. Betrachtet man als vereinfachtes Model eine ebene Fläche, die zu einer Halbschale deformiert wird, so kann die Energie aus der Scherbelastung folgendermaßen abgeschätzt werden:

$$E_0 = \frac{\mu S \langle u^2 \rangle}{2} \approx 0,5 \cdot 10^{-16} J \quad \text{Gl. 39}$$

mit Fläche einer Kugel $S = 1 \cdot 10^{-10} m^2$, die etwa der Oberfläche roter Blutkörperchen entspricht. Die Scherdeformation kann aus der Verformung einer ebenen Kreisfläche in eine Halbkugel bei unveränderter Fläche abgeschätzt werden, woraus sich $\langle u^2 \rangle \approx 0,17$ ergibt (vgl. [17]). Im Vergleich dazu ergibt sich die Biegeenergie einer Halbschale entsprechend aus:

$$E_B = 4\pi\kappa \approx 2,4 \cdot 10^{-18} J \quad \text{Gl. 40}$$

Da die Energie E_0 , die für die Scherung aufgebracht werden muss, deutlich größer ist als die Energie E_B aus der Biegung, lässt sich schlussfolgern, dass die Relaxationszeiten hauptsächlich durch die Scherelastizität des Zytoskeletts und Dissipation in der Membran kontrolliert sind. Deshalb wird hier angenommen, dass $\tau_s \approx \tau_1$ gilt.

Rotationsrelaxation τ_2

Die Rotationsrelaxation wurde zuerst von Fischer im Zusammenhang mit dem Formgedächtnis roter Blutkörperchen beschrieben [94]. Skotheim und Secomb stellten einen theoretischen Bezug zwischen Rotationsrelaxation und der Panzerkettenbewegung im linearen Scherfeld her [17]. In der

Panzerkettenbewegung ist die Winkelgeschwindigkeit vom Gleichgewicht zwischen dem externen Scherfeld als treibende Kraft und der Dissipation in der Membran bestimmt. In ihrem Modell berücksichtigten Skotheim und Secomb die Effekte des Zytoskelett-Formgedächtnisses auf die Panzerkettenbewegung der Membran [171]. Entsprechend der relativen Position des Zytoskeletts bei der Panzerkettenbewegung variiert dessen elastische Energie. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die elastische Energie E des Zytoskeletts eine periodische Funktion des relativen Winkels φ zwischen ursprünglicher und momentaner Position des Zytoskeletts ist. Die Periodizität beträgt dabei π und die Energie ergibt sich aus dem einfachen Zusammenhang $E = E_0 \sin^2 \varphi$. Die maximale Amplitude E_0 entspricht der maximal gespeicherten Energie in der gescherten Zellmembran. Diese kann aus der maximalen Winkelgeschwindigkeit ω_{max} der Rotationsbewegung und dem für das Bulk-Verhalten korrigierte Wert der Viskosität $\eta' = \eta_m/R$ abgeschätzt werden:

$$E_0 = V\eta' f_1 \omega_{max} \quad \text{Gl. 41}$$

Hierbei geht das Volumen roter Blutkörperchen $V \approx 90 \mu\text{m}^3$, der Faktor $f_1 \approx 15/4$, der den Deformationsgrad beschreibt [17] und ω_{max} , das Maximum der Winkelrotation $(d\varphi/dt)_{max}$ ein. Bei der Panzerkettenbewegung wird die Bewegung durch den äußeren Scherfluss getrieben, während hier in der Rotationsrelaxation die Rotationsbewegung durch die elastische Energie angetrieben wird, die im Zytoskelett gespeichert ist.

In der Rotationsrelaxation zeigt der Rotationswinkel φ eine lineare Abhängigkeit von der Zeit t (vgl. Abbildung 40 b). Nimmt man an, dass die dissipierenden Kräfte bei konstanter Winkelgeschwindigkeit $d\varphi/dt$ konstant sind, lässt dies auf ein konstantes treibendes Moment schließen, das ausgeglichen werden muss. Wenn der Anstellwinkel null wird, d.h. das Blutkörperchen die Gleichgewichtsform erreicht hat, wird das Moment ebenso abrupt null. Anstelle des sinusförmigen Zusammenhangs $E \sim \sin^2 \varphi$ lassen die Ergebnisse der Messungen allerdings eher auf eine dreieckförmige Oszillation mit Periodizität π schließen. Betrachtet man wiederum die Panzerkettenbewegung roter Blutkörperchen, so findet sich auch hier eine periodische Abhängigkeit vom Winkle φ für die gespeicherte elastische Energie des Zytoskeletts als eine der Panzerkettenbewegung überlagerte, schwingende Bewegung (*swinging* oder *breathing*). Dieses „swinging“ tritt beim Übergang von Taumelbewegung zu Panzerkettenbewegung auf und wurde erstmals von Abkarian et al. beschrieben [93]. Die charakteristische dreiecksförmige Winkeloszillation schwingender Blutkörperchen entspricht dabei sehr gut den hier vorgestellten Ergebnissen. Aus Gl. 41 und Gl. 39 lässt sich mit $\tau_2 = \pi/4\omega$ ein theoretisch erwarteter Wert für τ_2 abschätzen. Für die mittlerer Scherdeformation eines Blutkörperchens in der Panzerkettenbewegung wird $u = 0,2$ eingesetzt (nach [17]).

$$\tau_2 = \frac{1}{\omega_{max}} = \frac{\eta' V f_1 \pi}{\mu 2S \langle u^2 \rangle} \approx 6,7\text{s} \quad \text{Gl. 42}$$

Dieser Wert stimmt gut mit den experimentellen Werten überein und der vorgeschlagene, Zytoskeletts-gesteuerte Relaxationsmechanismus scheint durchaus plausibel, um die beobachtete Rotationsbewegung zu erklären.

Korrelation der Zeitskalen von Form- und Rotationsrelaxation

Trägt man die Werte der Relaxationszeiten τ_1 und τ_2 einzelner Zellen gegeneinander auf, erkennt man deutlich, dass beide Zeitskalen linear korreliert sind. Je langsamer die Formrelaxation τ_1 eines Blutkörperchens, desto langsamer ist auch dessen Rotationsrelaxation τ_2 . Da für $\tau_1 \approx \frac{\eta_m}{\mu}$ gilt, lässt sich schlussfolgern, dass der Beitrag der Biegeenergie sehr klein ist und $\tau_1 \approx \tau_s$ entspricht. Aus einer linearen Anpassung der Daten ergibt sich der Zusammenhang $\tau_2 \approx (36.4 \mp 4.7) \cdot \tau_1$ (vgl. Abbildung 42). Aus den obigen Gleichungen lässt sich zudem ein theoretischer Wert für den Zusammenhang beider Relaxationszeiten bestimmen

$$\frac{\tau_2}{\tau_1} = \frac{\pi V f_1}{2R \langle u^2 \rangle S} \approx 40$$

welcher sehr gut mit dem experimentellen Wert übereinstimmt. Da beide Relaxationszeiten deutlich miteinander korreliert sind, liegt es nahe, dass beide Werte auf denselben strukturellen Komponenten des Zytoskeletts basieren.

7.4.2 Einfluss von ATP auf das Relaxationsverhalten

Die elastischen Eigenschaften von Blutkörperchen lassen sich durch ATP modifizieren, was hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, dass die Phosphorylierung spezifischer Stellen im Zytoskelett nicht-kovalente Proteinbindungen schwächt [74]. Speziell die Phosphorylierung von Protein 4.1 beeinflusst die Bindung zwischen Spektrin, Aktin und Glykophorin C. Als Folge davon ist das Netzwerk an diesen Stellen weniger stabil und die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Proteine im gebundenen Zustand befinden, ist hier deutlich niedriger als im nicht-phosphorylierten Zustand [74]. Im zeitlichen Mittel tragen daher mit zunehmendem ATP-Gehalt weniger Spektre zur Elastizität des Netzwerkes bei und dessen Schermodul μ wird kleiner. Invers proportional dazu nimmt die Relaxationszeit mit zunehmendem ATP-Gehalt zu und sie nimmt ab mit abnehmendem ATP-Gehalt ($\mu \sim 1/\tau_2$). Trägt man die inversen Relaxationszeiten τ_2 gegen ihren abgeschätzten ATP-Gehalt auf, so wird dieser Zusammenhang eindeutig bestätigt, wie in Abbildung 43 gezeigt ist. Die Relaxationszeiten sind hierin auf die schnellste, bei einer Echinozyt gemessene Relaxationszeit $\tau_2^e = 0.29 \text{ s}$ normiert, unter der Annahme, dass dies in guter Näherung einem vollständig verknüpften Spektrinnetzwerk bei sehr niedrigem ATP-Gehalt entspricht.

Für die Vorstellung, dass durch ATP Spektrinmoleküle von Aktin abgelöst werden und somit sich die effektive Anzahl der verknüpften Spektre verringert, die zur Elastizität des Zytoskeletts beitragen, haben Gov et al. ein theoretisches Modell aufgestellt. Dieses Modell schätzt ab, wie die

Anzahl der stabil verknüpften Aktin-Spektrin-Bindungen (d.h. der nicht-phosphorylierten Protein 4.1 Stellen) mit dem ATP-Gehalt der Zelle korreliert. Dieses Modell soll mit der hier gemessenen Änderung der Relaxationszeit τ_2 in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration verglichen werden. Im Modell wird vereinfacht angenommen, dass in einer Zelle mit ATP-Konzentration n_{ATP} der Anteil der nicht verknüpften Spektrin-Enden n_d direkt proportional zur Anzahl der auf der Oberfläche des Zytoskeletts adsorbierten ATP-Moleküle ist. Der Anteil der Adsorbierten ATP-Moleküle wird im einfachsten Fall durch das thermodynamische Gleichgewicht der ATP Ad- und Desorption an einer Oberfläche beschrieben. Der Anteil der Adsorbierten ATP-Moleküle ist somit gegeben ist durch: $n_d = \frac{n_{ATP} e^\varepsilon}{1+n_{ATP} e^\varepsilon}$. Die für diesen Prozess nötige Energie ε wird mit $9 k_B T$ abgeschätzt [86], [142].

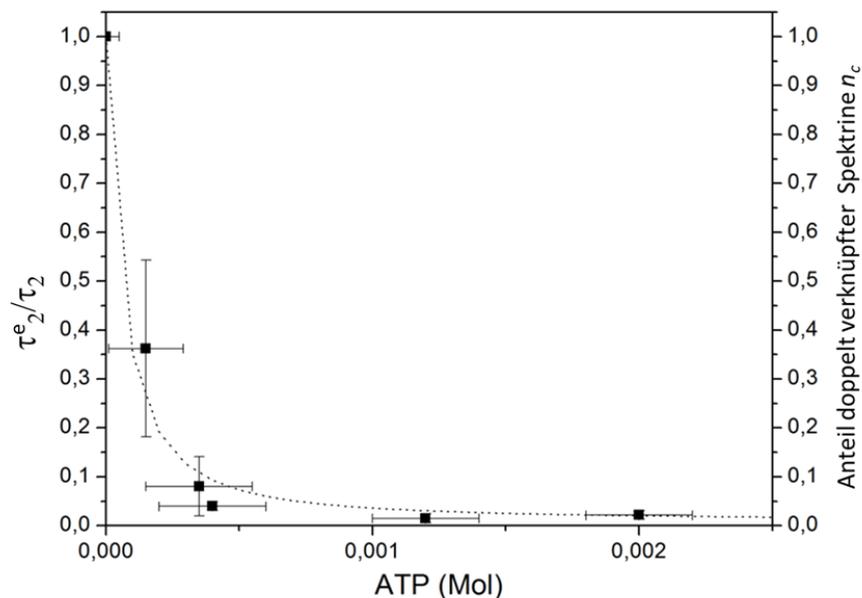


Abbildung 43: Das Schermodul der Membran ist der Relaxationszeit invers proportional ($\mu \sim 1/\tau_2$), die entsprechende Auftragung gegen den ATP-Gehalt der Zellen zeigt, das sich das Schermodul stark mit dem ATP-Gehalt der Zelle ändert. Die Werte sind normiert auf die kürzeste, an einem Echinozyten gemessene Relaxationszeit. Die gestrichelte Linie entspricht der aus dem ATP-Gehalt berechneten, theoretischen Netzwerkdicke (relative Anzahl der beidseitig verknüpften Spektrine) des Zytoskeletts [119] [86].

Weiterhin wird angenommen, dass das Schermodul des Zytoskeletts proportional zu $n_c = (1 - C * n_d)^2$ ist, also zum Anteil der Spektrinmoleküle, die an beiden Enden verknüpft sind [86], [119]. In dieser Funktion berücksichtigt der Parameter $C = \frac{\tau_{re}}{\tau_{dis} + \tau_{re}}$ den effektiven Anteil assoziierter und dissoziierter Spektrine und leitet sich aus den Zeitskalen der Dissoziation τ_{dis} und Reassoziierung τ_{re} ab. In der graphischen Darstellung der Werte von $1/\tau_2$ gegen die entsprechenden ATP Konzentrationen ist dieser theoretische Zusammenhang als gestrichelte Linie eingezeichnet,

mit zugehöriger y-Achse rechts (Abbildung 43). Aus dem Fit der experimentellen Werte erhält man $C \approx 0,91$ und kann damit schlussfolgern, dass für dieses Modell eine Re-Assoziationszeit zugrunde liegt, die etwa eine Größenordnung größer ist als die Zeit, die Spektrin für die Dissoziation von Aktin benötigt. Angewendet auf die Messdaten impliziert dieses Modell allerdings, dass das Zytoskelett bei physiologischen ATP-Gehalten ($\sim 1,5$ mM) fast vollständig dissoziiert vorliegen müsste. Schwächen des Modells liegen auch darin, dass die Energie ϵ , die der Prozess erfordert, nicht genau bekannt ist und andere ATP-verbrauchende zelluläre Prozesse vernachlässigt werden. Ebenso fließt in das Modell nicht ein, dass das Zytoskelett auch durch nicht-ATP-abhängige Mechanismen, z.B. Proteinfaltung, weicher werden kann. Der Vergleich mit dem Modell von Gov zeigt hier vor allem, dass die Änderung der Elastizität des Zytoskeletts mit der Änderung des ATP-Gehalts nach generellen thermodynamischen Gesetzen skaliert, die biochemischen Prozessen zugrunde liegen.

In der Tat kommen Li et al. in einer Simulation des Zytoskeletts roter Blutkörperchen, die durch enge Kapillaren fließen, zu dem Ergebnis, dass das Zytoskelett praktisch vollständig fluidisiert (vgl. Diskussion Kapitel 8, und Abbildung 48). Die Tatsache, dass es trotzdem sein Formgedächtnis behalten kann, d.h. dass Netzwerkdefekte (5-fach bzw. 7-fach Verknüpfungen), die die bikonkave Form bedingen, sich wieder in derselben Membranregion bilden, lässt sich durch die schnelle Fluktuation der Bindungen und die langsame Diffusion (in der Größenordnung von Sekunden für relevante Strecken von ca. 100 nm) von integralen Proteinen verstehen [126], [172]. Da Spektrin über Aktin und Ankyrin an integrale Proteine geknüpft ist und über hydrophobe Wechselwirkungen an der Innenseite der Plasmamembran adsorbiert, ist die Wahrscheinlichkeit eher gering, dass ein freies Spektrin-Ende zu einem weiter entfernt liegenden Aktin diffundiert. Generell kann durch die ständige Fluktuation der Bindungsbrüche im Netzwerk auch erklärt werden, dass selbst unterhalb der Perkulationsgrenze⁶ des Netzwerkes das Schermodul der Blutkörperchen nicht verschwindet [60], [86].

Der Einfluss von ATP auf die Relaxationszeit zeigt letztlich deutlich, dass die Elastizität des Zytoskelett aktiv durch energieverbrauchende Prozesse in der Zelle reguliert ist. Fehlt Energie in Form von ATP, nimmt dessen Elastizität ab. Durch Zugabe von ATP sind die durch metabolische Auszehrung hervorgerufenen Effekte reversibel. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die Effekte allein durch eine irreversible Schädigung z.B. Denaturierung von Proteinen hervorgerufen sind. Die enzymatische Natur der Regulierung bietet auch eine Erklärung für die beobachtete starke Streuung der Relaxationszeiten, die umso kleiner ist, je geringer der ATP-Gehalt ist. Bei hohem ATP Gehalt ist die Enzymaktivität der limitierende Faktor, wobei bekannt ist, dass die Enzymaktivität innerhalb der Zellpopulation eines Spenders stark schwankt [173]. Im umgekehrten Fall ist die (hier in allen Zellen ähnlich) geringe Substrat (ATP) Konzentration limitierend, was letztlich zu einer geringeren (absoluten) Streuung führt.

⁶ Unterhalb der Perkulationsgrenze besteht kein zusammenhängendes Netzwerk mehr. Es existiert mindestens ein Pfad ungebrochener Bindungen, der Das Netzwerk in zwei (oder mehr) nicht-zusammenhängende Teile teilt.

7.4.3 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

In diesem Kapitel wurde ein mikrofluidisches System vorgestellt, das neue Möglichkeiten zur Erforschung der viskoelastischen Eigenschaften stark verformter Blutkörperchen aufzeigt. Das beobachtete Relaxationsverhalten setzt sich zusammen aus einer schnellen (im Bereich von 200 ms) Umwandlung fallschirmförmiger Blutkörperchen in eine stomatozytische Form, gefolgt von einer langsamen (im Bereich von 10 s) Rotationsrelaxation in die endgültige bikonkave Form. Die Zeitskalen beider Relaxationen sind für einzelne Blutkörperchen miteinander korreliert und lassen sich durch eine Änderung des ATP-Gehalts beeinflussen. Das lässt den Schluss zu, dass beide Relaxationen auf das Schermodul des Zytoskeletts zurückzuführen sind. Sowohl die Relaxationszeiten als auch ihr linearer Zusammenhang konnte anhand eines viskoelastischen Modells erklärt werden.

Mit sinkendem ATP-Gehalt verkürzen sich die Relaxationszeiten um bis zu einer Größenordnung, der Effekt ist reversibel durch erneute Zugabe von ATP. Über ATP-abhängige, biochemische Prozesse reguliert das Blutkörperchen offensichtlich seine viskoelastischen Eigenschaften und damit die hier beobachtete Relaxation von Fallschirmform in Diskozyt. Zur Interpretation der ATP-abhängigen Regulierung des Zytoskeletts dient ein von Gov und Safran vorgestelltes Modell, das den Grad der Vernetzung des Zytoskeletts einerseits mit der Scherelastizität korreliert und andererseits mit dem intrazellulären ATP-Gehalt. Insgesamt sind die biochemischen Zusammenhänge und Abläufe im Zytoskelett jedoch sicherlich komplexer, als dass es vollständig in einem einfachen Modell erfasst werden kann. Im Folgenden werden daher einige weitere interessante Aspekte diesbezüglich erläutert.

Während Form und Formänderungen bei Systemen, die aus nur einer Schale aufgebaut sind (wie etwa Vesikel), allein durch das Oberflächen-Volumenverhältnis und die spontane Krümmung der Membran bestimmt ist, ist das Verhalten von Blutkörperchen zusätzlich durch die Kopplung zwischen seinen beiden Schalen (Plasmamembran und Zytoskelett) bestimmt. Beide sind mit einem relativ großen Abstand (ca. 30 nm) miteinander verbunden. Wird ein Blutkörperchen deformiert, so bewirkt diese Kopplung, dass sich lokal Gradienten lateraler Spannung bilden (oder umgekehrt, wenn sich Fläche bzw. Elastizität von Plasmamembran oder Zytoskelett ändert bewirkt diese Kopplung eine Deformation, vergleiche hierzu Kapitel 4). Diese lokalen Spannungen wirken komprimierend, wenn die Deformation relativ zum spannungsfreien Zustand konkav ist und sie wirkt expandierend, wenn sie konvex ist (vgl. Abbildung 44). Als Folge dieser lokalen Gradienten innerhalb der Plasmamembran und dem Spektrinnetzwerk bilden sich auch lokal unterschiedliche Verteilungen integrale Proteine aus [15], [69], [174]. Beispielsweise reichert sich (mobiles) Bande 3 in den konvexen Regionen der Plasmamembran an, während die Aktin-Konzentration hier geringer ist (vgl. hier auch Kapitel 4). Daher ist jede Deformation auch mit einer Umorganisation des Zytoskeletts verbunden [66], [69], [76]. Die Zeitskalen für diese Umorganisation sind kontrolliert durch das Gleichgewicht zwischen dem Knüpfen und Lösen chemischer Bindungen und der Diffusion der entsprechenden Komponenten.

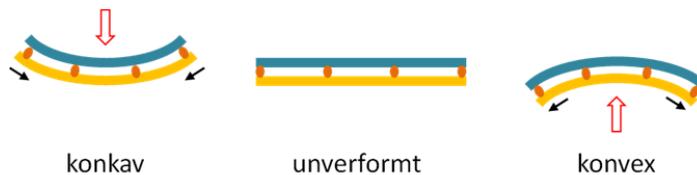


Abbildung 44: Das Zytoskeletts (gelb) ist an die Plasmamembran (blau) gekoppelt, wodurch sich lokale Spannungsgradienten bilden. Durch seine Scherelastizität wirkt das Zytoskelett bei einer konkaven Deformation komprimierend (schwarze Pfeile, linkes Bild) und expandierend bei einer konvexen Deformation (schwarze Pfeile, rechtes Bild).

Der Aufbau des Zytoskeletts ist vergleichbar mit dem von chemisch und werkstoffwissenschaftlich äußerst interessanten Formgedächtnispolymeren [95]. Stabile Knotenpunkte bestimmen die Grundform des Polymernetzwerkes. Die Polymerketten dazwischen können einen Phasenübergang durchlaufen und aufschmelzen (kontrolliert z.B. durch Temperatur oder mechanische in Form von Dehnung), wodurch solche Materialien reversibel in eine stabile, temporäre Form überführt werden können. Diese temporäre Form geht wieder in die Grundform über, wenn die Polymerketten wieder in ihre niederenergetische Phase überführt werden [95]. Als zusätzliches "Feature" kann im Blutkörperchen die Anzahl der stabilen Knotenpunkte (Spektrin-Aktin Verknüpfungen) mittelfristig über ATP reguliert werden. Worin die genaue Bedeutung des Formgedächtnisses roter Blutkörperchen liegt ist allerdings unklar. Denkbar wäre ein Zusammenhang mit der lateralen Sortierung von integralen Proteinen im ungesicherten Membran-Zustand.

ATP besitzt sehr wichtige physiologische Aufgaben im Körper. ATP wirkt gefäßerweiternd und ist damit an der Regulierung des kardiovaskulären Systems maßgeblich beteiligt. Auf mechanische Reize hin setzen roten Blutkörperchen in den Arteriolen und Kapillaren ATP frei. Ebenso setzen Herzmuskelzellen unter erhöhter Belastung ATP-frei [21], [23], [175]. Die Menge des von roten Blutkörperchen freigesetzten ATPs korreliert weiterhin mit deren Bewegungs-Regimes, wie Tauseln und Panzerkettenbewegung [137]. Die Bewegungs-Regimes wiederum werden von den elastischen Eigenschaften der Blutkörperchen beeinflusst, somit ermöglicht die Regulierung des Zytoskeletts durch ATP letztlich die Kontrolle verschiedener Zellfunktionen. Die gezeigte ATP abhängige Regulierung des Schermoduls lässt vermuten, dass ein erhöhter ATP Spiegel im Plasma die Effizienz des Blutflusses zusätzlich erhöht, indem die Blutkörperchen weicher werden.

Spektrin und eng verwandte Moleküle (z.B. Fodrin, Dystrophin) sind im Kortex (also direkt unterhalb der Plasmamembran) vieler Zellen zu finden, ebenso an zahlreichen anderen Biomembranen, wie etwa dem Golgi-Apparat oder intrazellulären Vesikel in Neuronen [6], [9]. Eine Sensitivität von Proteinen gegenüber mechanischen Reizen kommt nicht nur eine Schlüsselrolle für deren Deformierbarkeit und Stabilität zu, sondern auch für die Verarbeitung mechanischer Signale. So wurde beispielsweise berichtet, dass Spektrin möglicherweise als Mechano-Sensor fungiert, indem es in roten Blutkörperchen unter Scherbelastung auffaltet und so Bindungsstellen freigelegt werden, die sonst verborgen sind [67]. Die ATP abhängige Regulierung des Verknüp-

funksgrades des Zytoskeletts könnte wiederum ein eleganter Weg sein, die Mechano-Sensitivität selbst zu regulieren [67], [176], [177].

8 Chemisch modifizierte rote Blutkörperchen im Kapillarfluss

"Continuum mechanics models have been successful in treating whole-cell deformation in response to applied forces. However, structural information has to be included to address other biomechanical issues, because it is probably inadequate to simply lump all specific force-bearing, force-generating, and force-sensing structures into a structureless continuum." Zhou, Bao, Wang, 2000 [178]

8.1 Einleitung, Motivation und physiologischer Hintergrund

Im vorherigen Kapitel wurde diskutiert, wie eine Änderung des ATP-Gehalts von Blutkörperchen sich auf die Organisation des Zytoskeletts und dessen mechanische Eigenschaften auswirkt. In diesem Kapitel werden weitere Zusammenhänge zwischen molekularer Architektur und Funktion des Zytoskeletts aufgeklärt, indem Membranproteine gezielt durch zwei unterschiedliche Chemikalien modifiziert werden. Für die chemischen Modifikationen wird Formaldehyd (Methanal) und Diamid (Diazindicarboxylsäure-bis(N,N'-dimethyl)diamid) verwendet. Formaldehyd wird in seiner gelösten Form auch als Formalin bezeichnet. Die chemischen Modifikationen sollen das Zytoskelett versteifen und so eine Veränderung des dynamischen Verhaltens der Blutkörperchen im Kapillarfluss verursachen [179], [180]. Die modifizierten Blutkörperchen werden analog zu Kapitel 5 in verschiedenen Mikrokanälen untersucht. Dabei dienen die gefundenen Änderung der kritischen Geschwindigkeiten, bei denen die Formumwandlungen von Diskozyt in Pantoffelform beziehungsweise Pantoffelform in Fallschirmform ablaufen, als Maß für die veränderte Deformierbarkeit der chemisch modifizierten Blutkörperchen [90] [131].

Formaldehyd ist ein starkes Reduktionsmittel, das zwei beliebige Aminosäuren miteinander kovalent vernetzen kann, sofern diese sich räumlich nahe genug sind. Die chemische Reaktivität von Formaldehyd stabilisiert damit vor allem die Sekundärstruktur von Proteinen und verhindert beispielsweise, dass sich Proteindomänen auffalten können. In den Experimenten zeigt sich, dass diese Modifikation besonders die Formumwandlung von Pantoffelform in Fallschirmform behindert.

Diamid hingegen ist ein vergleichsweise spezifisch wirkendes Oxidationsmittel, das zwei Thiole zu einer kovalenten Disulfidbrücke oxidiert. Chemisch gesehen verhält sich Diamid sehr ähnlich wie reaktive Sauerstoffspezies (sogenannte freie Radikale, ROS), die ebenfalls als schädliche Zwischenprodukte des Stoffwechsels entstehen. Der Wirkungsort von Diamid im Protein lässt sich relativ genau ermitteln, denn von allen proteinogenen Aminosäuren enthält nur Cystein eine freie Thiolgruppe. Es ist bekannt, dass Diamid in nativen Blutkörperchen die α - und β -Kette des Spektrins miteinander kovalent vernetzt [129], [181], [182]. In den Experimenten wirkt sich diese

Modifikation besonders auf die kritische Geschwindigkeit zur Formumwandlung von Diskozyt in Pantoffelform aus.

In vivo und *in vitro* wurden die veränderten Eigenschaften chemisch modifizierter Blutkörperchen in zahlreichen Experimenten untersucht. In der Literatur ist unbestritten, dass reaktive Aldehyde wie Formaldehyd oder Glutardialdehyd rote Blutkörperchen versteifen [54], [136], [179]. Für Diamid gibt es jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Für unterschiedliche Messungen wurde, je nach Messmethode, entweder eine Versteifung oder auch keine bzw. nur eine geringfügige Verminderung der Verformbarkeit beobachtet [116], [179], [183], [184]. Diesen Sachverhalt haben erst kürzlich Stone et al. zusammengefasst und weiter untersucht [179]. Eine mögliche Erklärung wird in der Erhöhung der Viskosität der Membran bzw. des Zytosols durch die reaktiven Aldehyde gesehen.

Der Einfluss von Membran-versteifenden Chemikalien auf die Formänderung roter Blutkörperchen im Kapillarfluss wurde bisher nicht systematisch untersucht. Eine systematische Analyse des dynamischen Verhaltens chemisch modifizierter Blutkörperchen im Kapillarfluss verspricht neue Erkenntnisse für die spezifische Funktionsweise des Zytoskeletts. Besonders ein tieferes Verständnis für den Zusammenhang zwischen mechanischen Eigenschaften und molekularem Aufbau sind von großem Interesse. Ebenso wie diese auf chemischen Weg negativ beeinflusst werden und sich in Krankheiten auswirken.

Mögliche Ursachen für die Veränderung mechanischer Eigenschaften roter Blutkörperchen genauer zu verstehen ist auch deshalb besonders interessant, da sowohl beim natürlichen Alterungsprozess als auch bei verschiedenen Krankheiten Verformbarkeit und Elastizität der Blutkörperchen abnehmen. Dabei spielt sowohl das Alter der Blutkörperchen selbst ab als auch das Alter des Organismus eine Rolle [149]. Am Ende ihres Lebens werden Erythrozyten wegen erhöhter Steifigkeit und erhöhter Fragilität in der Milz aussortiert. Sie bleiben in den weniger als 3 µm großen Poren der Milz stecken, platzen und werden dann von Makrophagen recycelt [30]. Auch außerhalb der Milz findet Recycling geschädigter Blutkörperchen statt. Durch oxidative Agentien geschädigte Zellen können auch durch apoptose-ähnliche Mechanismen ihre Beseitigung selbst einleiten [185]. Die Zellen schnüren dabei Membranvesikel ab (vgl. Kapitel 4) und präsentieren bestimmte Signalmoleküle auf ihrer Oberfläche, welche die Makrophagen dazu veranlassen, die Blutkörperchen aufzunehmen und zu verdauen.

Von einigen Krankheiten ist bekannt, dass veränderte mechanische Eigenschaften auf erhöhten oxidativen Stress zurückzuführen sind, verursacht z.B. durch fehlerhafte Stoffwechselprozesse [186-188]. Auch bei (nicht ausreichend behandeltem) Diabetes Mellitus wird dies als eine wahrscheinliche Ursache für veränderte mechanische Eigenschaften der Blutkörperchen angenommen, mit all ihren negativen Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem [189].

Oxidative Schäden an roten Blutkörperchen können auch bei der Lagerung von Blutkonserven Ursache für ihre mit der Zeit abnehmende Funktionsfähigkeit sein. Während der Lagerung von Blutkonserven schnüren Erythrozyten kleine Vesikel ab, vergleichbar mit einer in Zeitlupe ablauf-

fenden Erythrozyten-Apoptose⁷. Diese Vesikelbildung kann durch Lagerung in hypotonischem Medium, das Glycerin enthält, vermindert werden [122]. Als Erklärung wird angenommen, dass Glycerin als Radikalfänger die Oxidation von Thiolgruppen verringert und damit das Zytoskelett vor schädlichen Proteinveränderungen schützt. Ein besseres Verständnis für die Auswirkung oxidativer Zellschäden ist daher auch hier von großem Interesse.

In den im Folgenden erläuterten Experimenten wird der Zusammenhang zwischen spezifischer Änderung der mechanischen Eigenschaften auf molekularer Ebene und dem dynamischen Verhalten roter Blutkörperchen im Kapillarfluss untersucht. Die Ergebnisse zeigen, wie sich inter- und intramolekular Quervernetzungen, insbesondere von Spektrin, auf die makroskopischen, mechanischen Zelleigenschaften auswirken. Eine wichtige physiologische Bedeutung liegt vermutlich darin, dass Spektrin als effektiver Sensor für oxidative und reduktive Zellschädigungen wirkt. Eine eingeschränkte Funktionalität der Blutkörperchen durch Proteinschäden, beispielsweise am HCO_3^- transportierenden Ionenkanal Bande 3 oder am Hämoglobin, können für den gesamten Organismus fatal sein. Ein zuverlässiges System, das Zellschäden registriert und geschädigte Zellen entfernt, ist überlebenswichtig.

8.2 Wirkungsweise von Formalin und Diamid

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden Vorkommen und physiologische Relevanz der verwendeten Chemikalien vorgestellt und die chemischen Wirkungsweisen näher erläutert. Im zweiten Abschnitt wird dann die sehr spezifische Wirkung von Diamid in roten Blutkörperchen beschrieben und dabei die wichtigsten Auswirkungen auf das Zytoskelett zusammengefasst.

8.2.1 Formalin und Diamid: physiologische Bedeutung und Reaktivität

Formalin ist eine mit Methanol stabilisierte, wässrige Lösung von Formaldehyd. Formaldehyd kommt in Säugerzellen als Zwischenprodukt im Stoffwechsel vor. Auch in unserer Umwelt kommen wir ständig in Kontakt mit Formaldehyd, da es bei Verbrennungsprozessen entsteht (z.B. im Zigarettenrauch), zur Herstellung von Kunststoffen (Phenolharze), Farbstoffen und Textilien verwendet und zur Konservierung von Kosmetika eingesetzt wird. Gasförmig oder in Aerosolen wird Formaldehyd schnell über die Schleimhäute im Nasen-Rachenraum und die Lunge ins Blut aufgenommen [190]. Formaldehyd entsteht zudem aus Methanol, das im Körper durch das Enzym Alkoholdehydrogenase schnell zu Formaldehyd oxidiert wird und so für den Körper giftig wirkt [191]. Aldehyddehydrogenasen oxidieren Formaldehyd zu der ebenfalls giftigen Ameisensäure und verhindern so, dass sich im Körper größere Mengen Formaldehyd ansammeln.

⁷ Als Apoptose wird der programmierte Selbstmord von Zellen bezeichnet. Da Blutkörperchen weder Zellkern noch endoplasmatische Retikulum besitzen können sie keine Apoptose im eigentlichen Sinne durchlaufen, um sich im Bedarfsfall selbst zu zerstören.

Aldehyde wie Formaldehyd und Glutardialdehyd werden wegen ihrer speziellen chemischen Reaktivität zur Konservierung von organischem Gewebe eingesetzt [7]. Formalin vernetzt Proteine kovalent, indem es zwischen einem Amin und einer nukleophilen Carbonylverbindung eine zusätzliche CH_2 -Gruppe erzeugt (Mannich-Reaktion) [192]. Mit Formalin chemisch reagierende Amine und Carbonyle sind in Proteinen zahlreich vorhanden, nämlich im gesamten Proteinerückgrat, ebenso in den Seitenketten einiger Aminosäuren. Allerdings müssen beide für eine kovalente Vernetzung durch Formalin räumlich nahe beieinander stehen. Auch dies ist innerhalb eines Proteins häufig der Fall, da Amin und Carbonylgruppe über eine Wasserstoffbrückenbindung miteinander wechselwirken und so auch die Sekundärstruktur von Proteinen stabilisieren. So wird beispielsweise das α -Helix Motiv in Proteinen stabilisiert (Abbildung 45), das auch in Spektrin das häufigste Motiv der Sekundärstruktur darstellt. In der Tat ist in der Literatur beschrieben, dass Formaldehyd die Sekundärstruktur von Proteinen derart stabilisiert, dass ein Aufschmelzen bzw. Denaturieren nicht mehr möglich ist, die Sekundärstruktur selbst bleibt erhalten [193]. Glutardialdehyd reagiert analog, führt aber anstatt einer $-\text{CH}_2$ - Gruppe eine $-\text{C}_5\text{H}_{10}$ -Gruppe ein. Glutardialdehyd vernetzt Proteine damit über eine deutlich größere Reichweite, wodurch auch intermolekulare Vernetzung wahrscheinlicher wird.

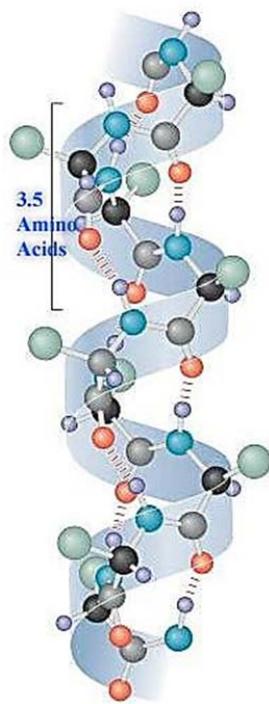


Abbildung 45: Die α -Helix ist eine der häufigsten Sekundärstrukturen in Proteinen [194]. Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Verbindungen) bilden sich zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff (rot) und Wasserstoffatom (lila) der Aminogruppe und stabilisieren so Proteinstrukturen. Die Proteinvernetzung durch Formalin findet zwischen dem C-Atom der Carbonylgruppe und dem Amin statt.

Als Oxidationsmittel verursacht Diamid ähnliche Zellschäden, wie typische Vertreter reaktiver Sauerstoffradikale, z. B. Hydroxylradikale und Superoxid-Radikal-Anionen [195]. Ein Diamidmolekül besitzt zwei reaktive Zentren und kann zwei benachbarte Thiolgruppen zu einer kovalenten Disulfidbrücke ($-\text{S}-\text{S}-$) oxidieren. Werden zwei räumlich nahe beieinander liegende Cystein-Reste

durch Diamid oxidiert, so werden dort die beiden Aminosäuren über eine Disulfidbindung miteinander quervernetzt.

Um sich vor Schäden durch oxidativen Stress zu schützen, haben Organismen Schutzmechanismen entwickelt [196]. In lipophiler Umgebung (innerhalb der Lipidmembran) wirkt das fettlösliche Vitamin E (Tocopherol) als Antioxidans. Im Zytosol schützt das Antioxidans Glutathion (GSH), das aus Cystein und zwei weiteren Aminosäuren aufgebaut ist, Proteine vor irreparablen Schäden durch Oxidation. Dabei werden zwei Monomere des GSH über eine Disulfidbrücke zu einem Dimer (GSSG) oxidiert, welches enzymatisch wieder zu zwei GSH recycelt werden kann. Auch gemischte Thiole aus einem GSH und einem Protein können entstehen. Im Zytosol herrscht daher durch die Wirkung von Antioxidantien ein reduzierendes Milieu, hier sind natürlicherweise keine Disulfidbrücken in Proteinen vorgesehen.

Während im Zellinneren Disulfidbrücken also unerwünscht sind, werden im extrazellulären Bereich Disulfidbrücken in Proteinen häufig spezifisch (katalysiert durch Enzyme) gebildet, um Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen zu stabilisieren. In Proteinen sind Disulfidbrücken dementsprechend für mechanische Festigkeit verantwortlich, z.B. in Fingernägeln oder Haaren. Ein sehr anschauliches Beispiel für die Funktion und gezielte chemische Veränderung von Disulfidbrücken in Proteinen ist die Dauerwelle. Für eine dauerhafte Verwandlung von glattem Haar in lockiges werden erst die Disulfidbindungen im Haar durch Thioglykolsäure geöffnet und anschließend zur Fixierung der neuen Form wieder zu Disulfidbrücken oxidiert. Als Oxidationsmittel wird dabei gewöhnlich Wasserstoffperoxid verwendet. Im Gegensatz dazu bewirken Fönfrisuren nur eine kurzzeitige Formveränderung von Haaren, weil hier nur die Positionen der Wasserstoffbrücken des Haarkeratins verändert werden, welche eine andere als die natürliche Form nicht dauerhaft stabilisieren können.

8.2.2 Diamid: spezifische Oxidation von Cysteinen in roten Blutkörperchen

Um veränderte mechanische Eigenschaften roter Blutkörperchen durch oxidative Schäden an den Membranproteinen zu erklären, ist ein Verständnis solcher Proteinmodifikationen auf molekularer Ebene hilfreich, vor allem was Spektrin betrifft. Die oxidative Wirkung von Diamid (und auch von ROS) auf die Proteine des Zytoskeletts roter Blutkörperchen ist biochemisch gut untersucht und charakterisiert. Für die Interpretation der Messergebnisse werden diese hier zusammengefasst und erläutert.

Insgesamt können in nativen Blutkörperchen bis zu 80% der in den Membranproteinen vorhandenen Cysteine durch Diamid zu Disulfidbrücken oxidiert werden [197]. Die restlichen 20 % sind in nativen Blutkörperchen so abgeschirmt, dass sie nicht oxidierbar sind. Im Spektrin wird die mittlere Anzahl der Cysteine mit 20 für α -Spektrin, beziehungsweise mit 15 für β -Spektrin angegeben. Davon liegen jeweils 3 Cysteine normalerweise im Inneren der Proteinstruktur verborgen und die Cysteine sind nicht regelmäßig über das gesamte Spektrin verteilt [67]. Haest et al. konnten biochemisch nachweisen, dass Diamid im Spektrin (ebenso in den restlichen Proteinen des

Zytoskeletts) Disulfidbrücken sowohl intramolekular bildet, also innerhalb eines Proteins, als auch intermolekular, also zwischen zwei Proteinen [116], [198]. Letzteres, die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken, hat die weitaus größere Bedeutung: 65 % aller Thiole bilden intermolekulare und nur 15% intramolekulare Disulfidbrücken (20% sind nichtreaktiv). Dies lässt den Schluss zu, dass im Spektrin-Tetramer die Thiolgruppen sich, wenigstens zeitweise, paarweise so nahe kommen, dass α - und β -Spektrin durch Oxidationsmittel kovalent quervernetzt werden [182], [199]. Nur ein geringen Anteil der Thiole in Spektrin (etwa 20 %) kann durch Glutathion vor der Quervernetzung geschützt werden [199]. Hier sei auch betont, dass die die Evolution die Cysteine in Proteinen in aller Regel nicht zufällig positioniert, sondern gezielt, um eine wichtige biologische Funktion zu erfüllen. Die etwa 20 % nicht-oxidierbaren Thiolgruppen des Zytoskeletts sind so in den gefalteten Proteinstrukturen verborgen, dass sie unter normalen Bedingungen (d.h. bei Blutkörperchen in Ruhe) für oxidative Agentien nicht zugänglich sind. Diese werden erst zugänglich, wenn das Protein denaturiert wird oder durch das Detergens Triton-X 100 solubilisiert wird⁸. In intakten Erythrozytenmembranen konnten diese verborgenen Cysteine nach einer Scherung der Membran zugänglich gemacht und selektiv angefärbt werden. Damit konnte bewiesen werden, dass sich Spektrin bei Blutkörperchen im Scherfluss mechanisch entfaltet. [67].

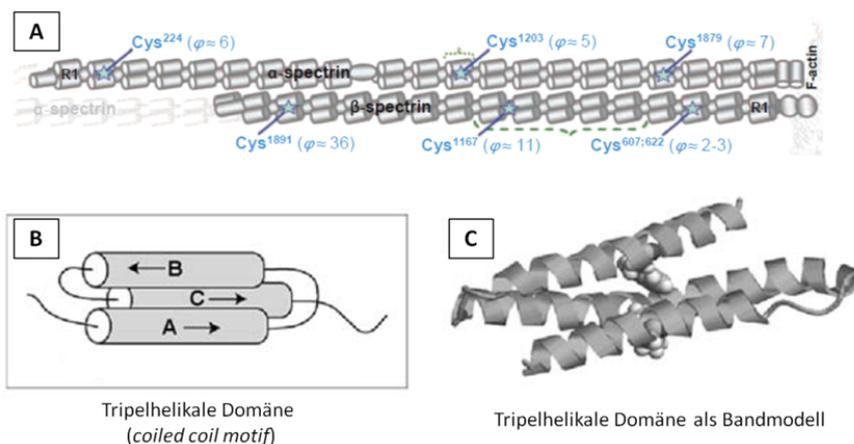


Abbildung 46: Schematische Struktur von α - und β -Spektrin (A), das 21 bzw. 17 gleichartige tripelhelikalen Domänen (B) besitzt. Normalerweise liegen α - und β -Spektrin nicht gestreckt nebeneinander, sondern umeinander gewunden vor (Überspiralisierung). In der Molekülstruktur verborgene Cysteine sind als Sterne gekennzeichnet. C: Die tripelhelikalen Domänen dargestellt als Bandmodell. Zusätzlich ist eine einzelne Protein-Seitenkette eingezeichnet. Diese Domänen aus α -Helices entfalten sich unter Krafteinwirkung. Dabei werden auch in der Faltung verborgene Seitenketten z.B. Cysteinseitenketten (Cys) zugänglich. Abbildungen entnommen und angepasst aus [67] und [200].

In biochemischen Analysen konnte Haest et al. weiterhin zeigen, dass die Quervernetzung von Spektrin nicht durch das im Zytosol vorhandene GSH verhindert werden kann, obwohl GSH in ei-

⁸ Triton-X denaturiert Proteine nur sehr schwach und wird u.a. verwendet um Membranproteine in ihrem nativen Zustand in Lösung zu bringen

ner relativ hohen Konzentration von ca. 2 mM vorliegt [182]. Im dichtgedrängten Zytosol, gerade an der Randschicht zwischen Plasmamembran und Zytoskelett, ist offensichtlich die lokale Konzentration von GSH zu gering ist, um Spektrin effektiv vor Oxidationsmitteln, die von außen eindringen, zu schützen.

Im Gegensatz zu intakten Blutkörperchen reicht in Geisterzellen⁹ bereits 0,5 mM GSH aus, um die kovalente Dimerisierung von Spektrin fast vollständig zu verhindern. Dieser Befund kann nicht allein durch Konkurrenzreaktionen von GSH mit Hämoglobin oder cysteinhaltigen Proteinen erklärt werden, die in Geisterzellen nicht mehr vorhanden sind. Haest vermutet daher eine strukturelle Änderung des Spektrins während der Präparation der Geisterzellen, die die Thiole für die Reaktion mit GSH zugänglich macht beziehungsweise die Thiole räumlich so weit voneinander entfernt, dass die Dimerisierung unmöglich wird [199]. Als Ursache für solche strukturelle Änderungen kommen sowohl niedrige Ionenstärken, die eine Expansion des Zytoskeletts bewirkt, als auch eine mechanische Dehnung während der hypotonischen Lyse der Blutkörperchen in Frage.

Auch andere Membranproteine sind empfindlich gegenüber Oxidation. Aktin besitzt etwa fünf Thiolgruppen, die nicht besonders gut vor Oxidation geschützt sind. In diesem Zusammenhang soll auch Bande 3 erwähnt werden, als weiteres Membranprotein mit wichtiger Funktion. Bande 3 kann durch Diamid kovalent zu Dimeren vernetzt werden, in intakten Zellen allerdings in geringem Ausmaß. [199].

Als häufigstes Protein im Zytosol enthält auch Hämoglobin einige reaktive Thiolgruppen, wobei Hämoglobin vergleichsweise gut durch GSH vor dauerhaften Schäden geschützt ist. Diamid bildet gemischte Disulfide zwischen GSH und Hämoglobin, was einer ausgedehnten Quervernetzung von Hämoglobinmolekülen und damit auch einer Erhöhung der Viskosität entgegenwirkt [199], [179].

Aus den biochemischen Untersuchungen an diamidbehandelten Blutkörperchen wird deutlich, dass Diamid die molekulare Struktur und folglich auch die Funktion des Zytoskeletts verändert. Dennoch gibt es in der Literatur widersprüchliche Berichte zur Auswirkung von Diamid auf die mechanischen Eigenschaften roter Blutkörperchen. Diamidbehandelte Blutkörperchen verhalten sich eindeutig steifer im linearen Scherfluss [116], [184], [201], in der Mikropipette [202] und nach Deformation im elektrischen Feld [203]. Auch charakteristische Änderungen im thermisch angeregten Flackern der Membran lassen auf eine erhöhte Biegesteifigkeit und Schersteifigkeit schließen [117]. Im Gegensatz dazu wurde in druckgetriebenen Systemen, wie etwa bei Messung der Passagezeiten in Filtrationsexperimenten [204], der Elongation im Poiseuillefluss [179] oder des Flusswiderstands *in vivo* [183] keine signifikante Versteifung gefunden.

⁹ Geisterzellen (*Ghosts*) werden hergestellt, indem man rote Blutkörperchen im hypotonischen Medium aufplatzen lässt. Sobald der osmotische Druck ausgeglichen ist verschließt sich Membran wieder. Mit dieser Methode lassen sich nicht membranlösliche Stoffe (z.B. zur Fluoreszenzfärbung) in die Zelle bringen. Der Name rührt daher, dass die Zellen ohne das hämoglobinhaltige Zytosol im Lichtmikroskop deutlich an Kontrast verlieren.

8.3 Theoretische Konzepte der Polymerphysik

Die Änderungen der mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts durch die chemischen Modifikationen werden hier insbesondere auf die chemische Modifizierung des Spektrins zurückgeführt. Diese Änderungen können mit Konzepten der Polymerphysik erklärt werden, die deshalb an dieser Stelle zusammenfassend beschrieben werden.

Spektrin ist ein langes, dünnes und äußerst flexibles Protein, das aus mehreren gleichartigen Untereinheiten (den 21 bzw. 17 Tripelhelices) aufgebaut ist [9], [144] (vgl. Abbildung 46). Damit kann es im Rahmen der Polymerphysik als lineares Polymer verstanden werden, das man sich im einfachsten Fall als dünne Schnur oder langes, flexibles Stäbchen vorstellen kann [60]. Für das elastische Verhalten solch eines Polymers sind zwei unterschiedliche molekulare Strukturprinzipien von Bedeutung. Zum einen kontrollieren einfache sterische bzw. energetische Gründe, die der Auslenkung von Atomen aus ihren energetisch günstigsten Positionen entgegen wirken, die mechanischen Eigenschaften von Molekülen, wie zum Beispiel die Einschränkung der Bewegungsfreiheit durch bestimmte Bindungswinkel in Proteinen. Diese Effekte sind bei niedrigen Temperaturen dominant. Zum anderen kann das elastische Verhalten durch entropische Effekte dominiert sein, da die Energie eines flexiblen Polymers durch die stochastische Verteilung seiner möglichen Konfigurationen bestimmt ist. Bei Raumtemperatur fluktuieren Moleküle daher um ein thermisches Gleichgewicht (Brownsche Molekularbewegung), ganz analog zu den Flächenundulationen der Plasmamembran (vgl. Kapitel 4). Das Verhalten von biologischen Makromolekülen wie Spektrin ist also bei Raumtemperatur im Wesentlichen von der Entropie bestimmt.

Wird ein Blutkörperchen verformt, so erfährt das Spektrinnetzwerk verschiedene Arten von Deformationen. Je nachdem ob die Kraft parallel zum Filament wirkt oder senkrecht, wird es entweder gedehnt (beziehungsweise komprimiert) oder gebogen. Anhand zweier Konzepte aus der Polymerphysik für diese beiden Arten der Deformation lassen sich die Ergebnisse der Messungen erklären [60]. Die wichtigsten Zusammenhänge werden im Folgenden dargestellt.

8.3.1 Dehnung einer idealer Polymerkette

Ein flexibles Polymer der Konturlänge L_c (Gesamtlänge) fluktuiert bei Raumtemperatur, so dass sich seine effektive Länge, der mittlere End-zu-End Abstandsvektor \mathbf{r}_{ee} , verkürzt. Die Orientierung der Segmente dieses idealen Polymers sind stochastisch verteilt, das Polymer fluktuiert in einem sogenanntem *random walk*. Die Persistenzlänge ξ_p des Polymers beschreibt nun die Längenskala, auf der sich die lokale Orientierung des Filaments nicht wesentlich ändert (vgl. Abbildung 47). Oder andersherum: ein Filament wird durch thermische Fluktuationen mit Wellenlängen in der Größenordnung der Persistenzlänge gebogen [60]. Die Persistenzlänge dient damit auch als Maß für die Steifigkeit eines Moleküls. Betrachtet man im einfachsten Modell das Polymer als ideale Kette (*Gaußsche Kette*, *random chain*), die frei beweglich ist, kein Volumen besitzt und keinerlei Wechselwirkungen mit sich selbst zeigt, so besteht zwischen dem mittleren End-zu-

End Abstand, der Konturlänge L_c und der Persistenzlänge ξ_P eines Polymers folgender Zusammenhang:

$$\langle \mathbf{r}_{ee}^2 \rangle = 2L_c \xi_P \quad \text{Gl. 43}$$

Dieser Zusammenhang ist gültig für Polymere, deren Persistenzlänge deutlich kleiner ist als deren Konturlänge. Wird das Polymer gestreckt und sein End-zu-End Abstand erhöht, verringert sich die Anzahl der möglichen Orientierungen bzw. Konfigurationen, die das thermisch fluktuierende Polymer einnehmen kann. Dies ist für die entropische Energie des Systems ungünstig. Die Entropie wirkt also einer Streckung des Polymers entgegen. Für kleine Auslenkungen $x \ll L_c$ ist die Kraft, die zur Streckung benötigt wird, proportional zur Änderung des End-zu-End Abstandes der Polymerkette im Gleichgewicht. Das Polymer verhält sich wie eine Hookesche Feder. Das elastische Verhalten des Polymers kann daher durch eine effektive Federkonstante

$$k_{sp} = 3k_B T / 2L_c \xi_P \quad \text{Gl. 44}$$

beschrieben werden [60]. Dieses Modell beschreibt nur für kleine Persistenzlängen $\xi_P \ll L_c$ ein flexibles Polymer, für $\xi_P \gg L_c$ liegt ein steifes Stäbchen vor. Dazwischen spricht man von einem semiflexiblen Polymer. Mit einer Konturlänge $L_c = 200 \text{ nm}$ und einer Persistenzlänge ξ_P zwischen 10 nm und 20 nm ergeben sich für die Federkonstante k_{sp} von Spektrin Werte zwischen $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ N/m}$ und $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ N/m}$. Diese Werte liegen damit etwa im selben Bereich wie experimentell bestimmte Werte für das Schermodul der Membran roter Blutkörperchen. Das Schermodul eines hexagonalen Netzes, das aus solchen entropischen Federn aufgebaut ist, lässt sich aus den Federkonstanten seiner Elemente nach

$$\mu = \sqrt{3} k_{sp} / 4 \quad \text{Gl. 45}$$

berechnen, wobei dieser Zusammenhang strenggenommen nur für niedrige Temperaturen und geringe Krafeinwirkung gültig ist [60].

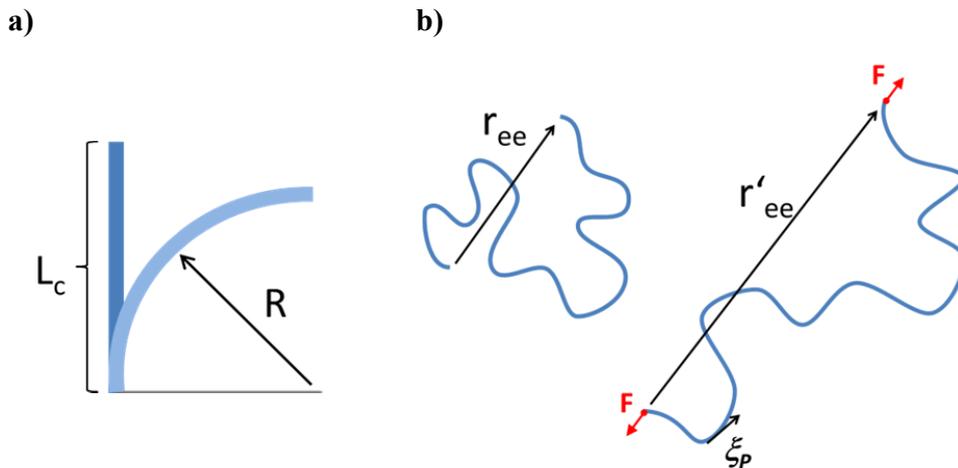


Abbildung 47 a) Biegung eines flexiblen Polymerstäbchens der Länge L_c um den Radius R . b) Mittlerer End-zu-End Abstandsvektor r_{ee} eines Polymers mit Biegefluktuationen in der Größenordnung der Persistenzlänge ξ_p und Verlängerung des End-zu-End Abstandes r_{ee} durch eine äußere Kraft F .

Als grobmaschiges Netzwerk aus entropischen Federn entspricht das Zytoskelett einem Elastomer wie z.B. Gummi. Das gummielastische Zytoskelett verhält sich allerdings nur für geringe Auslenkungen nach dem Hookeschen Gesetz. Bei der Scherung roter Blutkörperchen im Kapillarfluss wird Spektrin regelmäßig bis an seine Konturlänge gestreckt [144]. Für solch große Auslenkungen wird das Verhalten des Zytoskeletts daher stark nichtlinear und das Schermodul der Membran erhöht sich mit zunehmender Scherbelastung [65], [66]. Das Schermodul erhöht sich allerdings nur solange an, bis sich schließlich Domänen im Protein auffalten, dann erhöht sich die Konturlänge und das Polymer wird wieder flexibler. Ebenso können andere nicht-kovalente Bindungen brechen und das Netzwerk lokal aufreißen [68]. Das Zytoskelett wird damit wieder weicher und das Schermodul nimmt ab (Abbildung 48). Dieses Phänomen wird als *Networksoftening* bezeichnet. Johnson et al. konnten im linearen Scherfluss eine kritische Scherspannung $\sigma_{crit} \approx 0,5 Pa$ bestimmen, ab der die Auffaltung von Spektrindomänen nachgewiesen wurde. In dem $10\mu m \times 10\mu m$ PDMS-Kanal ist diese kritische Scherspannung etwa bei einer Geschwindigkeit $v_{RBC} \approx 200 \mu m/s$ erreicht, wenn man für den Abstand zwischen Kapillarwand und Membran des Blutkörperchens $1\mu m$ annimmt und für die Viskosität $\eta_{wasser} = 1 \cdot 10^{-3} Pa \cdot s$ (vgl. Kapitel 5).

In den formalinbehandelten Blutkörperchen ist die Sekundärstruktur des Spektrins fixiert. Ein Teil der helikalen Domänen kann selbst unter Krafteinwirkung nicht mehr aufgefaltet werden¹⁰. Daher ist zu erwarten, dass in diesen Blutkörperchen die Effekte des Networksoftenings deutlich schwächer sind.

Netzwerke aus idealen Polymerketten kollabieren oberhalb einer Kompression von $\tau_{coll} = -(\sqrt{3}/8)k_{sp}$ wenn sie komprimiert werden und Gl. 45 ist auch für diesen Fall nicht mehr gültig

¹⁰ Die in den Experimenten gewählte Formalinkonzentration ist so gering, dass nicht alle Domänen quervernetzt sind.

(Abbildung 49) [60]. Da das Zytoskelett ein ausgedehntes Volumen besitzt, kann es zwar nicht im eigentlichen Sinne kollabieren, aber auch hier ist zu beachten, dass es nur bis zu einem gewissen Grad komprimiert werden kann. Dieser Grenzfall ist vermutlich in den Mikropipetten-Experimenten von Bedeutung, in dem die Membran beim Eintritt in die Pipette lokal stark komprimiert wird.

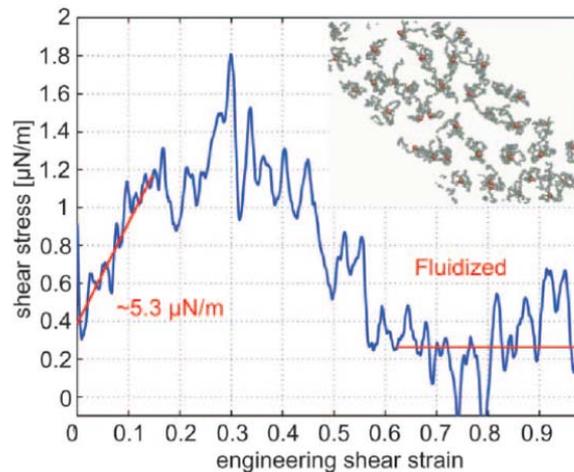


Abbildung 48: Simulation eines Spannungs-Dehnungs-Diagramms roter Blutkörperchen, Abbildung entnommen aus [72]. Das Schermodul nimmt bei hoher Belastung ab (Networksoftening), da sich Domänen im Spektrin auffalten und Bindungen im Netzwerk schließlich aufbrechen, wie oben rechts schematisch dargestellt ist [65] [72], [144].

Bei den diamidbehandelten Zellen sind die umeinander gewundenen α - und β -Spektrinmoleküle miteinander quervernetzt, ihre Freiheitsgrade (mögliche Molekül-Orientierungen) werden dadurch stark eingeschränkt. Die beiden Polymere sind aneinander geheftet und Biegefluktuationen werden unterdrückt. Mit zunehmender intermolekularer Vernetzung wird das Modell der entropischen Feder daher ungünstig und man erhält ein semiflexibles Stäbchen. Die Elastizität des Spektrins bleibt nur soweit erhalten, wie sich die einzelnen Atome des Spektrins aus ihrer bevorzugten Konformation auslenken lassen (Einhaltung von Bindungswinkel, sterische Effekte) oder schließlich die tripelhelikalen Domänen kooperativ entfalten.

8.3.2 Biegesteifigkeit eines flexiblen Stäbchens

Betrachtet man die Biegeelastizität eines Polymers, so kann diese als dünnes Stäbchen mit einheitlichem Radius R_f und einheitlicher Dichte betrachtet werden (vgl. Abbildung 47 a). Die Biegesteifigkeit κ_f des Stäbchens lässt sich kontinuumsmechanisch aus dem Elastizitätsmodul Y (E-Modul bzw. Young-Modul) des Materials und dem Flächenträgheitsmoment J berechnen [60].

$$\kappa_f = YJ \quad \text{Gl. 46}$$

Das Flächenträgheitsmoment ist eine aus dem Querschnitt des Stäbchens abgeleitete Größe, die zur Beschreibung des Widerstands gegen die Biegung benötigt wird. Für ein zylinderförmiges Stäbchen mit konstanter Dichte gilt $J = \pi R_f^4/4$. Über die Persistenzlänge

$$\xi_p = \kappa_f/k_bT \quad \text{Gl. 47}$$

lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem Kontinuumsmechanischen Modell eines flexiblen Stäbchens und dem molekularen Modell thermisch fluktuierender Polymere herstellen:

$$\kappa_f = YJ = \xi_p \cdot k_B T \quad \text{Gl. 48}$$

Die Energie E_b , die für die Biegung des Polymerstäbchens mit Radius R_f und Länge L um den Krümmungsradius R nötig ist (vgl. Abbildung 47), ist gegeben durch [79]:

$$E_b/L = \kappa_f/2R^2 = YJ/2R^2 \quad \text{Gl. 49}$$

Für ein zylinderförmiges Stäbchen skaliert das Flächenträgheitsmoment mit der vierten Potenz des Stäbchenradius R_f , daher skaliert auch die Biegesteifigkeit bzw. die Biegeenergie des Stäbchens mit der vierten Potenz seines Radius. Daraus ist ersichtlich, dass schon eine geringe Änderung der Dicke eines Polymerfilaments eine sehr starke Auswirkung auf die Kraft hat, die für die Biegung um einen Krümmungsradius R aufgewendet werden muss.

In den mit Diamid modifizierten Blutkörperchen werden die α - und β -Kette eines Spektrins kovalent miteinander vernetzt und daher in ihrer gewellten Form fixiert. Bei dieser chemischen Modifikation muss daher eine höhere Kraft aufgewendet werden, um das Spektrin aus dieser Form auszulenken und den End-zu-End Abstand zu erhöhen. Hinsichtlich der Biegesteifigkeit des Spektrins kann diese intermolekulare Quervernetzung auch als eine Änderung des Radius des Polymeren interpretiert werden. Die Modifikation durch Diamid sollte sich damit auf das Verhalten der Blutkörperchen besonders dann auswirken, wenn die Membran eine starke lokale Krümmung erfährt. Ein Networksoftening durch das Entfalten von Protein Domänen sollte allerdings nicht unterbunden sein. Da die Spektrin α - und β - Ketten aneinander gepinnt sind und kooperativ entfaltet werden müssen, sollte für die Aktivierung des Networksoftenings eine höhere Kraft notwendig sein.

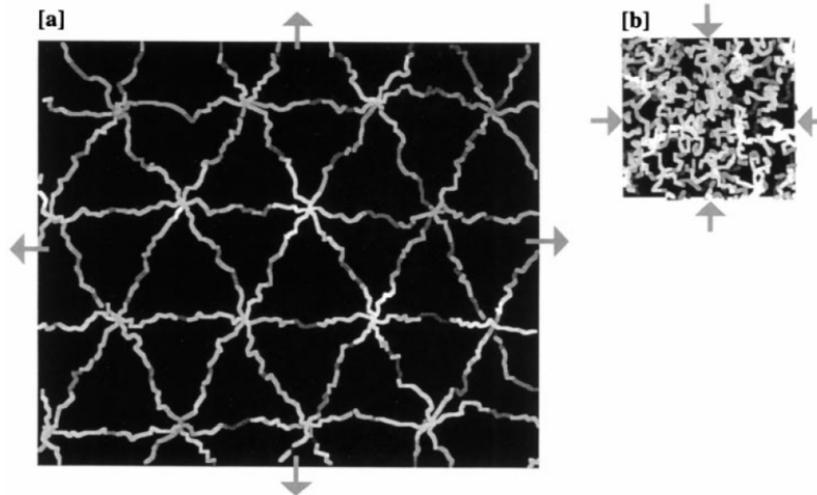


Abbildung 49. Simulation eines idealisierten, entropischen Polymernetzwerkes, das das Zytoskelett roter Blutkörperchen repräsentiert. Dehnung (a) und Komprimierung (b) des Zytoskeletts als pseudo-dreidimensionale Darstellung [65]: die Spektrine sind so gezeichnet, dass die Bereiche, die dem Betrachter entgegen kommen, heller sind und die Bereiche, die weiter hinten liegen, dunkler sind. Bei einer starken Kompression (b) müssen die Spektrine stark verbogen und geknäuel werden. Durch die chemische Modifikation des Zytoskeletts mit Diamid wird diese Art der Deformation erschwert.

Weiterhin muss man sich verdeutlichen, dass für eine starke lokale Flächenkompression bzw. Scherungen auch die Biegesteifigkeit der einzelnen Filamente eine wichtige Rolle spielt. Besonders für die Stauchung muss das an seinen beiden Enden fixierte Spektrin stark gebogen werden, um seinen End-zu-End Abstand zu verkürzen (vgl. Abbildung 49). Das Verhalten des Blutkörperchens bei einer starken lokale Kompression bzw. Scherungen des Zytoskeletts hängt also auch von der Biegesteifigkeit der Spektrine ab.

8.3.3 Abgeleitete Hypothesen

Aus Konzepten der Polymerphysik für die entropische Elastizität eines Polymers und die Biegesteifigkeit eines dünnen Stäbchens lassen sich folgende Arbeitshypothesen aufstellen: Diamid erhöht die Biegesteifigkeit des Spektrins und erschwert damit eine starke (lokale) Krümmung des Zytoskeletts (vgl. Abbildung 58 a). Auch die Streckung des Spektrins bis zu seiner vollen Konturlänge ist hier erschwert. Für Formalin ist im Gegensatz dazu zu erwarten, dass besonders die vollständige Auffaltung der tripelhelikalen Spektrin-Domänen unterbunden wird und damit der Networksoftening-Mechanismus erschwert wird (vgl. Abbildung 58 b). Anhand dieser Thesen kann überprüft werden, welche molekularen Mechanismen für die dynamische Umformung roter Blutkörperchen relevant sind.

8.4 Experimente und Ergebnisse

Hier wurden zunächst die modifizierten Membranen biochemisch analysiert, um eine intramolekulare Quervernetzung der Membranproteine der roten Blutkörperchen nachzuweisen. Dies geschieht mittels Gelelektrophorese. Die Änderung der Verformbarkeit der chemisch behandelten Blutkörperchen wurde statisch mittels Mikropipetten-Aspiration vermessen. Die Auswirkungen der chemischen Modifikationen auf das dynamische Verhalten im Kapillarfluss wurden sowohl in den PDMS-Kanälen mit quadratischem Querschnitt als auch in runden Glaskapillaren untersucht, um dynamische Phasendiagramme zu erstellen (analog zu Kapitel 5). Eine Änderung der kritischen Geschwindigkeiten dient hierbei als Maß für die Änderung der elastischen Eigenschaften der Blutkörperchen.

8.4.1 Analytik der modifizierten Zytoskelettproteine

Die Membranproteine der nativen und der chemisch modifizierten Erythrozyten wurden in einer SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Dies erlaubt Rückschlüsse darauf, welche Proteine der Blutkörperchen kovalent quervernetzt wurden und auch in welchem Ausmaß. Die SDS-PAGE wird sowohl unter reduzierenden, als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen, durch Zugabe von Dithiothreitol, durchgeführt (Abbildung 50 A bzw. B). In der nicht-reduzierenden SDS-PAGE bleiben Disulfidbrücken in Proteinen erhalten, während sie im anderen Fall wieder zu zwei freien Thiolen reduziert werden. Dies gilt auch für die Disulfidbrücken, die durch Diamidbehandlung zusätzlich erzeugt wurden. Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in Abbildung 50 gezeigt. Die für Blutkörperchen charakteristischen Proteinbanden sind deutlich zu erkennen, ebenso signifikante Änderungen durch Formalin- und Diamidbehandlung [7], [182], die im Folgenden erläutert werden.

Die quantitative Auswertung der nicht-reduzierenden SDS-PAGE zeigt, dass, im Vergleich zu den unbehandelten Blutkörperchen, sowohl die mit Formalin als auch die mit Diamid behandelten Proben eine große Menge zusätzlicher Proteine mit Molekulargewichten größer als 250 kDa (HMW-Spezies) aufweisen. Die Intensität fast aller Banden, und entsprechend der Proteinmenge, ist nach Formalinbehandlung nahezu unverändert. Verringerte Proteinmengen finden sich für die Banden des Proteins 4.1 und β -Spektrin (vgl. Abbildung 51). Im Gegensatz dazu ist nach Diamidbehandlung die Intensität praktisch aller Banden, und damit die Proteinmenge, signifikant kleiner. Überproportional stark sind dabei die Bande von Protein 4.2 und von Aktin (Bande 6) verringert.

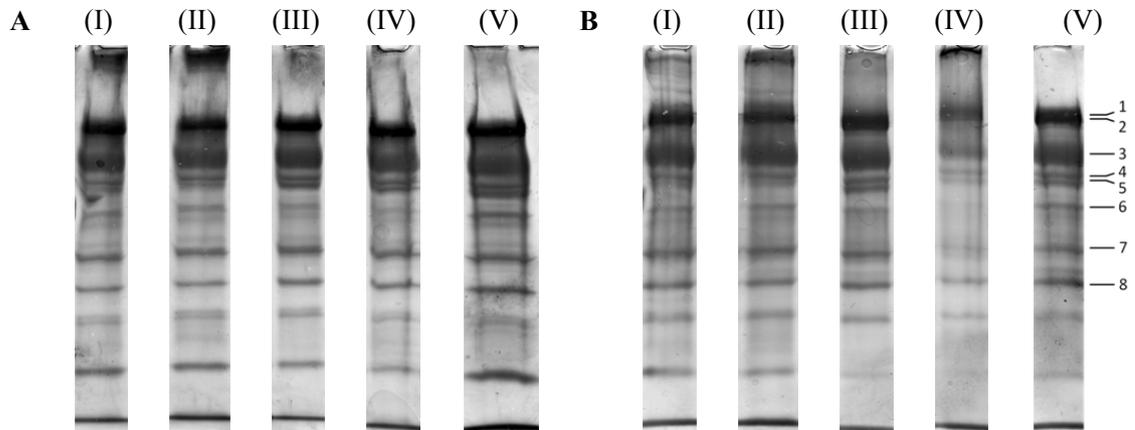
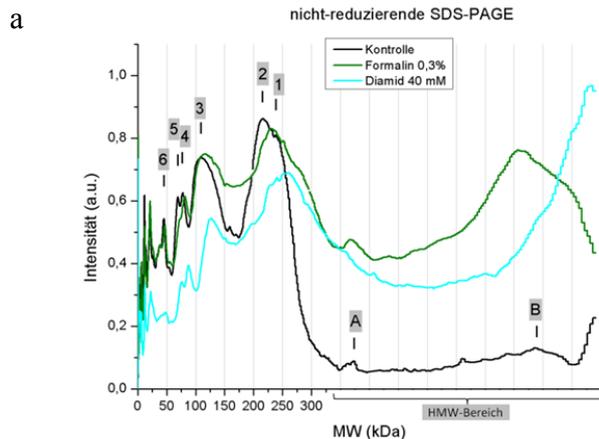


Abbildung 50: Auftrennung der Membran-Proteine von Erythrozyten Geisterzellen durch (A) reduzierende und (B) nicht-reduzierende SDS-Gelelektrophorese. Von links nach rechts wurden Membranproteine aufgetragen die mit: (I) Formalin 0,15%, (II) Formalin 0,30%, (III) Diamid 20mM, (IV) Diamid 40mM behandelt wurden sowie (V) native Membranproteine. Zuordnung der Proteinbanden nach [7]: (1) α -Spektrin (240kDa), (2) β -Spektrin (220kDa) + Ankyrin (210kDa), (3) Bande 3 (100kDa) (mit Glykophorin A), (4) Bande 4.1 (82kDa), (5) Bande 4.2, (6) Aktin (43kDa).

In den formalinbehandelten Proben konnte keine signifikante intermolekulare Vernetzung von Spektrin und Bande 3 festgestellt werden, denn die Intensität der Proteinbanden unterscheidet sich nicht signifikant von denen nativer Blutkörperchen. Wie erwartet vernetzt Formalin diese Proteine nicht intermolekular. Im Gegensatz dazu zeigt die verringerte Proteinmenge nahezu aller Laufbanden nach Diamidbehandlung, dass diese intermolekular über die Disulfidbrücken zu Proteinaggregaten mit großen molekularen Gewichten quervernetzt werden. Damit kann das Entstehen der neuen, intensiven Banden bei sehr großen Molekulargewichten (HMW-Banden) erklärt werden. Ein weiterer Teil der Proteinmenge im HMW-Bereich ist höchstwahrscheinlich auf agglomerierte zytosolische Proteine zurückzuführen, die sich bei der Präparation der Geisterzellen nicht vollständig aus dem Zellinneren auswaschen ließen. Letzteres wird auch für formalinbehandelte Zellen angenommen.

Ein Beleg dafür, dass verschiedene HMW-Proteinagglomerate durch Diamid und Formalin entstehen, liefert die reduzierende SDS-PAGE. Der HMW-Bereich unterscheidet sich von den unbehandelten Zellen nur unwesentlich, denn die im nicht-reduzierenden Gel vorhandenen Disulfidbrücken sind hier wieder zu freien Thiolgruppen reduziert. Bei den formalinbehandelten Zellen sind die Proteinmengen im HMW-Bereich noch vorhanden und werden daher auf irreversible Protein-Quervernetzung durch Formalin zurückgeführt. Die Ergebnisse sind konsistent mit Berichten aus der Literatur [116], [182], [197-199].



Zuordnung der Proteinbanden nach [7]:

(1) α -Spektrin (240kDa)

(2) β -Spektrin (220kDa)

(3) Bande 3 (100kDa)

(4) Bande 4.1 (82kDa)

(5) Bande 4.2

(6) Aktin (43kDa)

(A) Proteinaggregate mit hohem MW

(B) Proteinaggregate mit hohem MW (evtl. Spektrin-Oligomere)

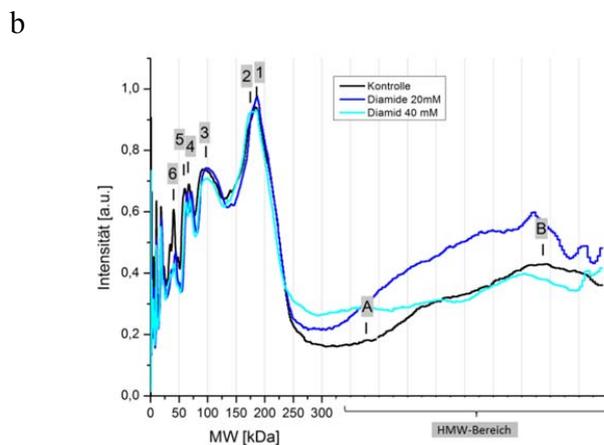


Abbildung 51: Quantitativ Auswertung der SDS-PAGE: relative Intensität der aufgetrennten Proteinbanden, aufgetragen gegen das Molekulargewicht; (a) unter nicht-reduzierenden und (b) unter reduzierenden Bedingungen. Proteinaggregate sehr hoher molekularer Gewichte (HMW) können nicht aufgetrennt werden, sie bleiben im weitmaschigen Bereich (Sammelgel). In diesem Bereich können die Molekulargewichte der Banden nicht quantitativ ermittelt werden.

8.4.2 Starke lokale Deformation: Mikropipetten-Aspiration

Die Mikropipetten-Aspirationstechnik stellt eine gängige Methode zur Bestimmung elastischer Eigenschaften von Zellen oder auch Lipidvesikel dar [205]. Hierbei wird ein Blutkörperchen mittels Unterdruck in eine dünne Glaskapillare (Durchmesser zwischen 2 und 3 μm) eingesaugt, aus dem Verhältnis von Druck und Länge des eingesaugten Membranstückes (relative Deformation) lassen sich elastische Eigenschaften der Blutkörperchen bestimmen (vgl. Abbildung 52). Die Durchmesser der verwendeten Glaskapillare sind dabei so klein, dass die Blutkörperchen nicht vollständig eingesaugt werden können.

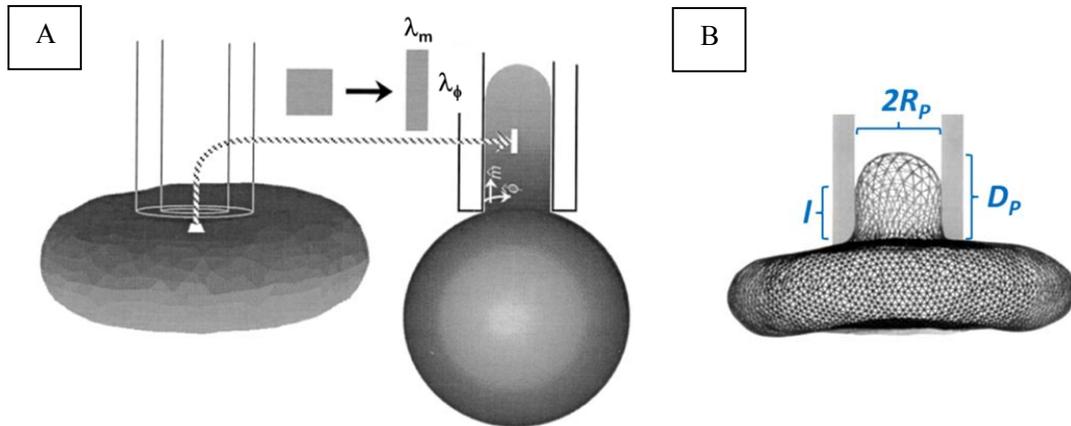


Abbildung 52. Mikropipetten-Aspirationstechnik zur Bestimmung des Schermoduls roter Blutkörperchen. Bei dieser Messung wird ein zunächst ebenes Membranstück durch einen Unterdruck P um die Einsauglänge D_p in die Pipette gesaugt. Die Membran wird dabei geschert und lokal stark gekrümmt, wenn es in die Pipette gebogen wird. A: Veranschaulichung der Scherung eines Membranstückes (weiß eingezeichnet). B: Simulation des Zytoskeletts beim Einsaugen in die Mikropipette mit Radius R_p und mit einem Druck ΔP (modifizierte Abbildungen aus [66]). Das Schermodul der Membran lässt sich bestimmen für Bereiche mit $D_p > R_p$, wo sich die Länge l des zylindrischen Membranstückes durch die Dehnung des Zytoskeletts erhöht.

Aus der Länge der eingesaugten Membranzunge D_p , dem verwendeten Unterdruck ΔP und dem Radius der Kapillare R_p lässt sich das Schermodul μ der Membran über folgenden Zusammenhang bestimmen [14]:

$$\frac{D_p}{R_p} = \frac{\Delta P R_p}{\mu} + b \quad \text{Gl. 50}$$

Der y-Achsenabschnitt b ergibt sich aus dem Offset-Druck der benötigt wird, um die Zelle zu Beginn an die Pipette anzusaugen. Die entsprechende Auftragung der Messdaten sind in Abbildung 53 gezeigt. Zur Bestimmung des Schermoduls aus der Auftragung von D_p/R_p gegen $\Delta P R_p$ ergibt sich ein linearer Bereich in der Region $1,5 < D_p/R_p < 6$, der zur Bestimmung des Schermoduls verwendet werden kann [202]. Die Länge der eingesaugten Membranzunge D_p wird erst bestimmt, wenn diese beim jeweiligen Druck in ihre Gleich-gewichtslänge relaxiert ist. Das Schermodul μ ergibt sich aus dem Kehrwert der Steigung der Geraden, die in diesem Bereich an die Messdaten angepasst ist (Abbildung 53). Für $D_p/R_p < 1,5$, also zu Beginn der Messung, wenn das Blutkörperchen in die Pipette eingesaugt wird, ist der Einfluss der Biegesteifigkeit hoch, denn die Membran muss hier sowohl um die Mündung der Pipette als auch zur Bildung der Zungenkappe stark gebogen werden. Erst wenn die Membran des Blutkörperchens mindestens um die Länge des Pipettenradius R_p eingesaugt, wird bei einer weiteren Erhöhung des Ansaugdruckes vor allem das Zytoskelett geschert und insbesondere das zylindrischen Membranstück wird länger (vgl. Abbildung 52) [61], [202].

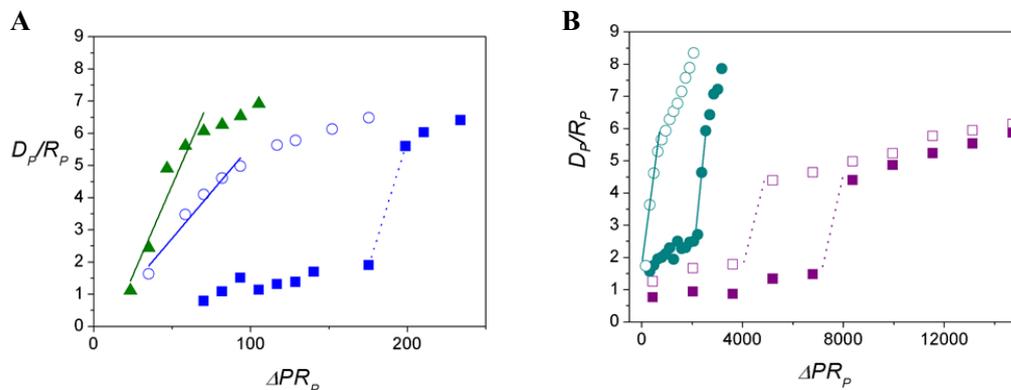


Abbildung 53: Ermittlung des Schermoduls aus den Messungen mit der Mikropipette. **A)** Auftragung der Aspirationslänge D_p gegen den Druckunterschied ΔP für ein natives Blutkörperchen (grüne Dreiecke), und mit Formalin der Konzentrationen 0,15% (6 mM) (offene blaue Kreise) und 0,30% (12 mM) (gefüllte blaue Kreise) behandelte Blutkörperchen. **B:** Glutaraldehyd (0,075 %, 0,75 mM offene cyanfarbene Kreise und 0,15 %, 1,5 mM: gefüllte Kreise), Diamid 20 mM (offene violette Quadrate) und 40 mM (gefüllte violette Quadrate) werden erheblich höhere Drücke gebraucht.

Die Werte für die ermittelten Schermodule der nativen und chemisch veränderten Blutkörperchen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Während sich für Formalin 0,15 % das Schermodul etwa verdoppelte und der Kurvenverlauf dem nativer Blutkörperchen entspricht, ist für Formalin 0,30 % ein signifikanter Knick bei $D_p/R_p \approx 2$ im Kurvenverlauf vorhanden. Dieser ergibt sich dadurch, dass ein fast zwanzigmal höherer Ansaugdruck benötigt wird, um die Membranzunge zu Beginn der Messung zu bilden. Für die diamidmodifizierte Blutkörperchen sind die dafür benötigten Ansaugdrücke sogar um mehr als drei Größenordnungen erhöht, bis sich schließlich die Membran weiter in die Pipette einsaugen lässt und für $D_p/R_p > 1,5$ das Membran-Schermodul bestimmt werden kann. Daraus wird deutlich, dass die diamidbehandelten Blutkörperchen sich in dieser statischen Messung deutlich steifer verhalten als die formalinbehandelten Blutkörperchen, insbesondere wenn starke lokale Krümmungen der Membran erforderlich sind.

Weiterhin wurden Blutkörperchen in der Mikropipette vermessen, die mit Glutaraldehyd behandelt wurden. Glutaraldehyd vernetzt Proteine durch denselben chemischen Mechanismus wie Formalin, kann aber aufgrund seiner Molekülgröße Proteine auch intermolekulare quervernetzen. Verglichen mit Formalin führen offensichtlich deshalb deutlich geringere molare Konzentrationen von Glutaraldehyd (1,5 mM vs. 6 mM Formalin) zu einer deutlich höheren Versteifung der Blutkörperchen (vgl. Abbildung 53). Sowohl der Druck, der benötigt wird, um das Blutkörperchen um mindestens $2 D_p/R_p$ einzusaugen ist um mehr als eine Größenordnung erhöht, als auch das ermittelte Schermodul der Membran. Mit Glutaraldehyd behandelte Blutkörperchen können daher Effekte, die auf inter- bzw. intramolekulare Quervernetzung zurückzuführen sind, nicht unterschieden werden. Glutaraldehyd wird deshalb im Folgenden für die dynamischen Experimente

nicht verwendet. Es verdeutlicht hier aber sehr anschaulich, wie die intermolekulare Quervernetzung die Elastizität der Blutkörperchen beeinflusst.

Tabelle 3: Mit der Mikropipetten-Aspiration gemessene Schermodule μ . Für die diamidbehandelten Blutkörperchen wurden außergewöhnlich hohe Drücke benötigt, um die Zellen überhaupt in die Mikropipette einsaugen zu können. Die Werte für das Schermodul konnten daher nur grob bestimmt werden und sind daher in Klammern gesetzt.

	μ [mN/m]
nativ	8,9 ± 3,0
Formalin 0,15%	17 ± 4,0
Formalin 0,3%	6,3 ± 2,6
Glutardialdehyd 0,075%	136 ± 31,1
Glutardialdehyd 0,15%	127 ± 28,2
Diamid 20 mM	(600)
Diamid 40mM	(550)

8.4.3 Dynamisches Verhalten in Kanälen mit konstantem Querschnitt

Das dynamische Verhalten der chemisch veränderten Blutkörperchen im Kapillarfluss wurde analog zu Kapitel 5 in PDMS-Kapillaren mit einem konstanten Querschnitt von $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ untersucht. In diesem Setup wird der Einfluss der Kapillarwände durch Reibung als gering betrachtet. Aus der Anpassung von Boltzmannfunktionen an die Messpunkte wurden die kritische Geschwindigkeit v_{crit_1} für die Formumwandlung von Diskozyt in Pantoffelform und v_{crit_2} für die Formumwandlung von Pantoffelform in die Fallschirmform bestimmt. Die kritischen Geschwindigkeiten entsprechen einer Häufigkeit der jeweiligen Form von 50 %.

Die Änderungen beider kritischen Geschwindigkeiten sowie die Änderung der Maximalen Häufigkeit der Pantoffelform sind in Abbildung 54 grafisch dargestellt. Für die formalinbehandelten Zellen ändert sich v_{crit_1} gering, während sich für die diamidbehandelten Zellen $v_{crit_1} = 1100 \pm 200 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zu nativen Zellen etwa verdoppelt (vgl. Kapitel 5.2). Weiterhin nimmt v_{crit_2} für beide chemischen Modifikationen mit $2300 \pm 230 \mu\text{m/s}$ für formalinbehandelte Blutkörperchen und mit $3040 \pm 260 \mu\text{m/s}$ für diamidbehandelte Zellen sehr stark. Für native Zellen liegen beide kritischen Geschwindigkeiten in dieser Kapillargeometrie nahe beieinander und damit auch die entsprechenden Kräfte, die die Formumwandlung bewirken. Während für Formalin nur für die Formumwandlung von Pantoffelform in Fallschirmform deutlich höhere Kräfte nötig sind, muss für Diamid zusätzlich auch für die Umwandlung von Diskozyt in Pantoffelform eine deutlich höhere Kraft auf die Blutkörperchen wirken.

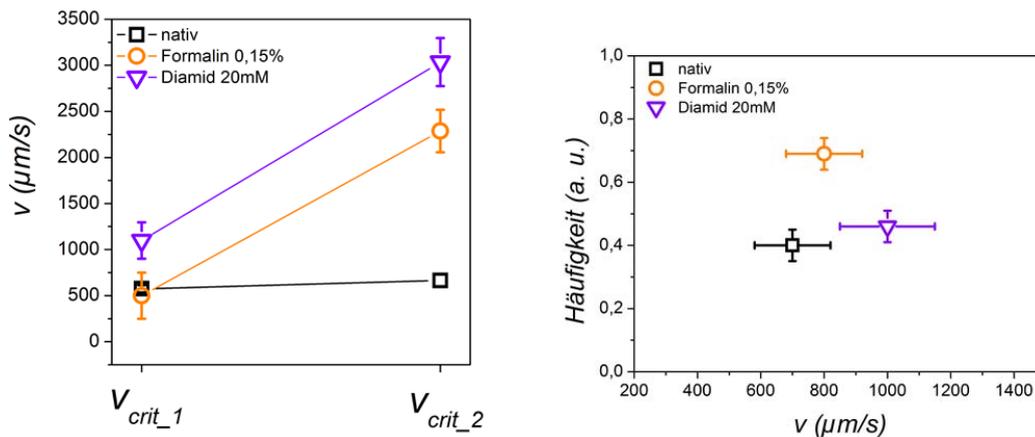


Abbildung 54: Links: Erhöhung der kritischen Geschwindigkeiten v_{crit_1} und v_{crit_2} der chemisch veränderten Blutkörperchen in PDMS-Kapillaren mit konstantem Querschnitt ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$). Die Kraft, die auf die Blutkörperchen im Kapillarfluss wirkt, ist direkt proportional zur Geschwindigkeit (Stokes Reibung). Durch Diamid wird sowohl v_{crit_1} für die Umwandlung von Diskozyt in Pantoffelform als auch v_{crit_2} für die Umwandlung von Pantoffelform in die Fallschirmform deutlich erhöht. Durch Formalin wird hingegen v_{crit_1} wenig beeinflusst und nur v_{crit_2} erhöht sich deutlich. Rechts: Änderung der maximalen Häufigkeit der Pantoffelformen. Ähnlich wie für native Blutkörperchen in engen Kapillaren erhöht sich die maximale Häufigkeit der Pantoffelformen bei formalinbehandelten Zellen (Erklärung siehe Text).

Bei den formalinbehandelten Zellen nimmt weiterhin die maximale Häufigkeit der Pantoffelform deutlich zu. Dies wird auch für native Zellen bei kleinem Kapillardurchmesser und hoher Wandwechselwirkung beobachtet. Die formalinbehandelten Zellen verhalten sich also ähnlich wie native Zellen in engen Kapillaren. Obwohl auch für diamidbehandelte Zellen beide kritischen Geschwindigkeiten weit auseinander liegen, nimmt das Maximum der Pantoffelformen bei diesen nicht zu. Der Grund hierfür ist, dass die Zahl der Diskozyten mit zunehmender Geschwindigkeit deutlich langsamer abnimmt als bei den formalinbehandelten Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass für diamidbehandelten Blutkörperchen die diskozytische Form stabilisiert ist. Diskozyten treten daher noch bei höheren Geschwindigkeiten auf, für formalinbehandelte Zellen hingegen ist die Pantoffelform stabilisiert.

8.4.4 Dynamische Phasendiagramme

Die dynamische Formumwandlung der chemisch behandelten Zellen wurden, analog zu Kapitel 5.2.4, in sich langsam verjüngenden Glaskapillaren mit rundem Querschnitt untersucht. Aus den Messergebnissen wurden Phasendiagramme in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Blutkörperchen und dem Kapillardurchmesser erstellt. Das Phasendiagramm für formalinbehandelte Blutkörperchen ist in Abbildung 56 gezeigt, das für diamidbehandelte in Abbildung 57. Das grün schraffierte Gebiete entspricht dabei jeweils einer Häufigkeit der Diskozyten von mindestens 50%, die durchgezogene Grenzlinie entspricht dem Verlauf der kritischen Geschwindigkeit v_{crit_1} . Im

blau schraffierten Gebiete treten mindestens 50 % Fallschirmformen auf, die Grenzlinie entspricht v_{crit_2} . Das Gebiet, in dem die Pantoffelform mit einer Häufigkeit von 20%-80% auftritt, ist für eine bessere Übersichtlichkeit jeweils in einem gesonderten Diagramm dargestellt (rot schraffiert).

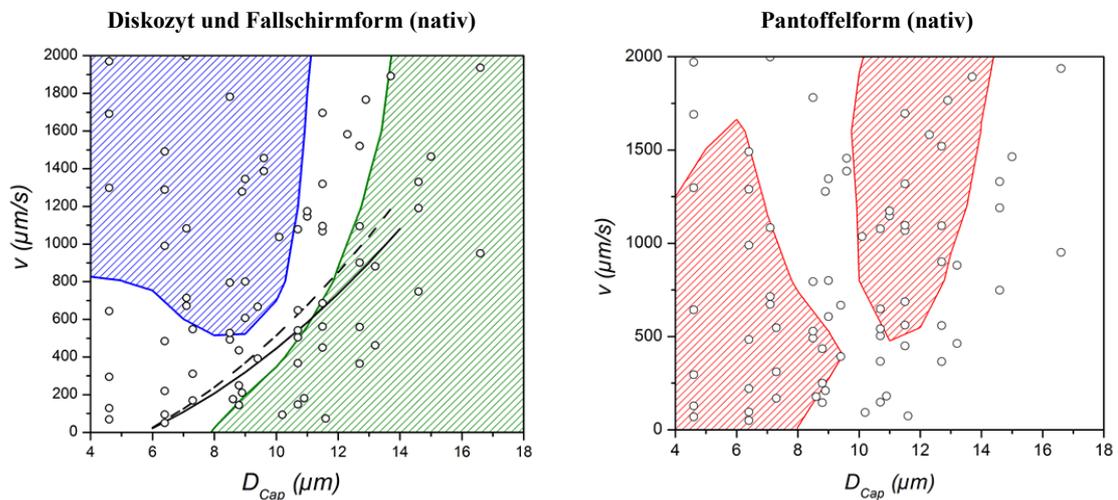


Abbildung 55: Phasengebiete der dynamischen Formen nativer roter Blutkörperchen im Kapillarfluss: Diskozyt (grün), Fallschirmform (blau), Pantoffelform (rot), zur besseren Übersichtlichkeit in zwei getrennten Diagrammen dargestellt. Die schwarze durchgezogene Linie entspricht der extrapolierten kritischen Krümmung c^* des Flussprofils für v_{crit_1} (durchgezogene Linie) bzw. v_{crit_2} (gestrichelte Linie) aus der Messung im $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ PDMS-Kanal (vgl. Kapitel 5.2.4).

Die offenen Kreise im Diagramm sind die Messpunkte, an welchen die Verteilung der verschiedenen Formen bestimmt wurde. Aus der Interpolation zwischen den Messpunkten ergibt sich das experimentelle Phasendiagramm. In der folgenden Beschreibung der Ergebnisse werden die Effekte der chemischen Modifikationen mit den nativen Zellen verglichen. Zum einfacheren Vergleich der Ergebnisse ist ein entsprechender Ausschnitt des Phasendiagramms für native Blutkörperchen aus Kapitel 5 auch an dieser Stelle abgebildet (Abbildung 55).

Auch für die chemisch modifizierten Blutkörperchen werden die kritischen Geschwindigkeiten verwendet, die im PDMS-Kanal mit konstantem Querschnitt gemessen wurden, um die kritische Krümmung c^* des Flussprofils zu berechnen (Gl. 35). Der Verlauf von c^* für v_{crit_1} und v_{crit_2} ist zum Vergleich mit den Ergebnissen der Phasendiagramme als durchgezogene bzw. gestrichelte schwarze Linie in Abbildung 55 eingezeichnet (vgl. Kapitel 5.3).

Einfluss von Formalin

Für formalinbehandelten Blutkörperchen ist die Grenze des Diskozyten-Gebietes, also der Verlauf der kritischen Geschwindigkeit v_{crit_1} , für Geschwindigkeiten über $500\ \mu\text{m/s}$ zu kleineren Kapillardurchmessern hin verschoben (vgl. Abbildung 56). Im Vergleich zu unbehandelten Blutkörperchen findet bei entsprechender Geschwindigkeit die Formumwandlung erst bei etwa $1\ \mu\text{m}$

bis 2 μm kleineren Kapillardurchmessern statt. Die mit Formalin modifizierten Blutkörperchen behalten länger ihre diskozytische Form, sie sind also weniger leicht deformierbar.

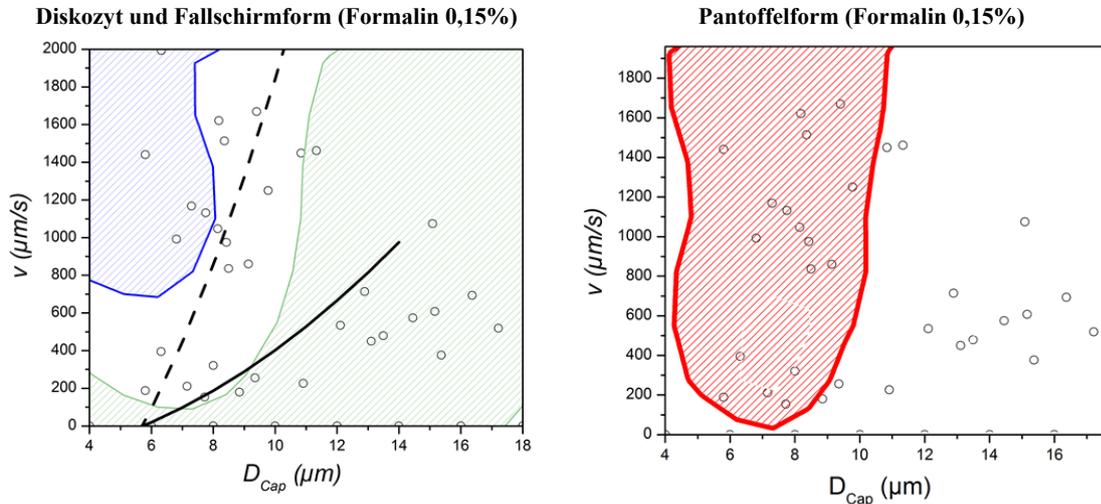


Abbildung 56: Phasegebiete der dynamischen Formen formalinbehandelter roter Blutkörperchen im Kapillarfluss: Diskozyt (grün), Fallschirmform (blau), Pantoffelform (rot). Die schwarze durchgezogene bzw. die gestrichelte Linie entsprechen den aus der kritischen Krümmung des Flussprofils extrapolierten Werten, aus den Daten der Messung im $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ PDMS-Kanal, entsprechend der Phasengrenzen von Diskozyt und Fallschirmform. Im Vergleich zu den nativen Zellen sind die Grenzen der Gebiete hin zu höheren Geschwindigkeiten und kleineren Kapillardurchmesser verschoben (Erklärung s. Text)

Weiterhin ist deutlich zu sehen, dass die formalinbehandelten Zellen bereits bei größeren Kapillardurchmessern (etwa $8,5 \mu\text{m}$) in das Regime gelangen, in welchem die kritische Geschwindigkeit nahezu unabhängig vom Kapillardurchmesser ist. Hier ist der Formübergang von der Geschwindigkeit des Flusses, beziehungsweise der Reibung zwischen Blutkörperchen und der Kapillarwand, dominiert. Verglichen mit nativen Blutkörperchen lässt daraus sich schließen, dass die modifizierten Blutkörperchen bereits bei größeren Kapillardurchmessern eine räumliche Einschränkung bzw. Wandreibung erfahren, verursacht durch ihre verringerte Verformbarkeit. Die kritische Geschwindigkeit v_{crit_1} ist im Bereich kleiner Kapillardurchmesser ($D_{Cap} < D_{RBC}$) zu höheren Geschwindigkeiten hin verschoben, von weniger als $50 \mu\text{m/s}$ auf $100 \mu\text{m/s}$ bis $200 \mu\text{m/s}$. Die für die Formumwandlung notwendige Kraft $F = \eta A \frac{v}{z}$ (Gl. 22), die aufgrund der Flüssigkeitsreibung zwischen Blutkörperchen und Kapillarwand wirkt, liegt also für die mit Formalin modifizierten Zellen knapp eine Größenordnung höher.

Das Gebiet der Fallschirmform ist für die formalinbehandelten Blutkörperchen deutlich verkleinert. Zum einen ist die untere Grenze um etwa $200 \mu\text{m/s}$ zu höheren Geschwindigkeiten verschoben. Zum anderen tritt die Fallschirmform erst bei kleineren Kapillardurchmessern unterhalb $8 \mu\text{m}$ auf. Auch hier wird deutlich, dass höhere Kräfte für die Formumwandlung von Pantoffelform zu Fallschirmform nötig sind, die Blutkörperchen sind in diesem Regime steifer.

Ebenso wie für die nativen Zellen kann der Verlauf der kritischen Geschwindigkeiten anhand der Krümmung c^* des Flussprofils mit den experimentellen Werten aus der Messung der kritischen Geschwindigkeit im PDMS-Kanal mit konstantem $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ Querschnitt extrapoliert und mit den Phasendiagramm verglichen werden (siehe Abbildung 56). Dabei entspricht v_{crit_1} (grüne Linie) im Bereich $6\ \mu\text{m} < D_{Cap} < 11\ \mu\text{m}$ etwa dem daraus erwarteten Verlauf (schwarze durchgezogene Linie). Der Verlauf der kritischen Geschwindigkeiten v_{crit_2} (blaue Linie) entspricht im Bereich $6\ \mu\text{m} < D_{Cap} < 8,5\ \mu\text{m}$ etwa dem anhand der Krümmung des Flussprofils vorhergesagten Verlauf (schwarze gestrichelte Linie).

Für hohe Geschwindigkeiten laufen beide kritischen Geschwindigkeiten für Kapillardurchmesser $D_{crit_1} \approx 11\ \mu\text{m}$ und $D_{crit_2} \approx 8\ \mu\text{m}$ jeweils gegen unendlich. Das heißt, auch durch eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit ändert sich die Häufigkeit von Diskozyten, Pantoffelform und Fallschirmform nicht mehr. Die beiden kritischen Kapillardurchmesser sind im Vergleich zu nativen Zellen zu kleineren Werten verschoben. Mögliche Ursache hierfür kann sowohl eine höhere Viskosität der Blutkörperchen sein, die die Relaxation in die jeweilige dynamische Form verlangsamt, als auch eine Erhöhung der Elastizitätsmodule der Blutkörperchen (vgl. Kapitel 5).

Die Pantoffelform tritt in der Messung ebenso wie die Fallschirmform erst bei kleineren Kapillardurchmessern ($D_{Cap} < 10\ \mu\text{m}$) auf. Das Gebiet für 20%-80% Pantoffelformen ist für native Zellen zweigeteilt. Für Kapillardurchmesser zwischen $9\ \mu\text{m}$ und $10\ \mu\text{m}$ liegen beide kritischen Geschwindigkeiten für den Formübergang so nahe beieinander, dass die Formen praktisch direkt ineinander umgewandelt werden. Die Pantoffelform zeigt hier für die nativen nur eine sehr geringe Häufigkeit. Im Gegensatz dazu liegen für die formalinbehandelten Zellen beide kritischen Geschwindigkeiten (grüne und blaue Linie) immer so weit voneinander entfernt, dass die Pantoffelform vergleichsweise Häufigkeit in einem großen Gebiet auftritt. Die Pantoffelform ist in diesem Regime also stabilisiert.

Durch eine intermolekulare Quervernetzung der Proteinen des Zytosols durch Formalin erhöht sich die innere Viskosität der Blutkörperchen [63], wodurch sich die Formumwandlung, d.h. die Relaxation in eine (neue) dynamische Gleichgewichtsform, verlangsamt (vgl. hierzu auch Abschnitt 5.2.3). Dies bewirkt, dass sich mit zunehmender Geschwindigkeit des Flusses die Grenzen des Phasengebietes stärker hin zu kleineren Kapillardurchmessern verschieben, verglichen mit nativen Blutkörperchen oder mit einem Setup mit konstantem Kapillarquerschnitt. Als wichtiges Kriterium für die Einschätzung dieses Effekts dient hier die Extrapolation der kritischen Geschwindigkeit aus der Messung mit konstantem Querschnitt (schwarze Linie). Für Geschwindigkeiten größer als $700\ \mu\text{m/s}$ (v_{crit_1}) bzw. größer als $1400\ \mu\text{m/s}$ (v_{crit_2}) weichen die Grenzen der Phasengebiete stark von den erwarteten Werten ab. Oberhalb dieser Geschwindigkeiten ist die Strecke, die ein Blutkörperchen in der Kapillare innerhalb der Relaxationszeit zurücklegt, so groß, dass die neue Gleichgewichtsform in der Messung erst bei einem kleineren Kapillardurchmesser erfasst wird. Daher sind die Ergebnisse in diesem Bereich nicht mehr direkt mit dem Verhalten in Kapillaren mit konstantem Querschnitt vergleichbar.

Einfluss von Diamid

Für die diamidbehandelten Zellen ist der Verlauf der kritischen Geschwindigkeit v_{crit_1} (grüne Linie) stufenförmig (vgl. Abbildung 57). Im Bereich $8,5 \mu\text{m} < D_{Cap} < 11,0 \mu\text{m}$ ändert sich v_{crit_1} mit der Änderung von D_{Cap} deutlich geringer als bei nativen Blutkörperchen. Um $D_{Cap} \approx 8,5 \mu\text{m}$ nimmt die kritische Geschwindigkeit stark ab und fällt im Bereich $4,0 \mu\text{m} < D_{Cap} < 8,5 \mu\text{m}$ auf einen konstanten Wert von $v_{crit_1} \approx 200 \mu\text{m/s}$. Ähnlich wie bei den formalinbehandelten Blutkörperchen beginnt das Regime mit starken Wandwechselwirkungen bei $D_{Cap} \leq 8,5 \mu\text{m}$, also bei einem etwas größeren Kapillardurchmesser im Vergleich zu nativen Zellen. Die Deformierbarkeit ist für geringe Geschwindigkeiten und kleine Kapillardurchmesser ähnlich stark erhöht, wie bei formalinbehandelten Blutkörperchen. Auffällig ist eine deutliche, starke Abnahme von v_{crit_1} bei $D_{Cap} \approx 8,5 \mu\text{m}$. Diese kann damit erklärt werden, dass sich hier die elastischen Eigenschaften der Blutkörperchen relativ plötzlich signifikant ändern. Sie werden deutlich leichter deformierbar und v_{crit_1} sinkt stark von knapp $700 \mu\text{m/s}$ auf etwa $450 \mu\text{m/s}$.

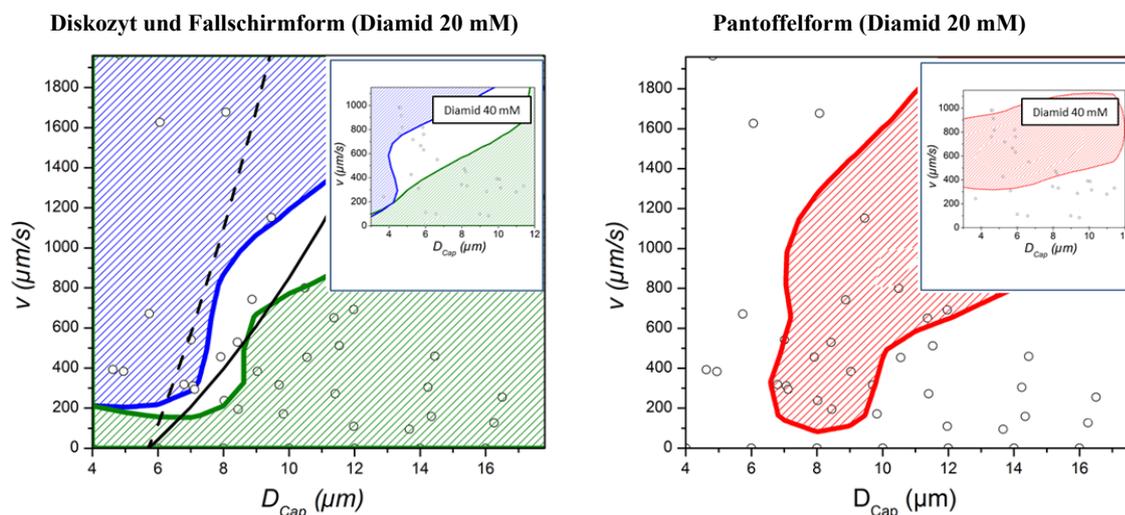


Abbildung 57: Phasengebiete der dynamischen Formen diamidbehandelter roter Blutkörperchen im Kapillarfluss: Diskozyt (grün), Fallschirmform (blau), Pantoffelform (rot). Die schwarze durchgezogene bzw. gestrichelte Linie entspricht den aus der kritischen Krümmung des Flussprofils extrapolierten Werten (mit den entsprechenden Daten aus der Messung im $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ PDMS-Kanal) für den Formübergang von Diskozyt und Fallschirmform. Besonders signifikant ist, dass die Grenzen des Gebiets der Fallschirmform bei kleinen Kapillardurchmessern hin zu niedrigeren Geschwindigkeiten verschoben ist (Erklärung s. Text).

Die Häufigkeit der Fallschirmform diamidbehandelter Blutkörperchen ist im Vergleich zu nativen Blutkörperchen im Bereich starker Wandwechselwirkungen von $D_{Cap} < 8,5 \mu\text{m}$ deutlich erhöht. Mit $v_{crit_2} \approx 200 \mu\text{m/s}$ tritt hier die Umwandlung in die Fallschirmform bei deutlich niedrigeren Geschwindigkeiten ein. Die Blutkörperchen werden hier im Regime mit hohen Wandwechselwirkungen bei Geschwindigkeiten über $200 \mu\text{m/s}$ offensichtlich deutlich weicher bzw.

elastischer als native Zellen. Entsprechend ist die Pantoffelform in diesem Bereich des Phasendiagramms nicht häufig, der Diskozyt formt sich praktisch direkt in die Fallschirmform um.

Der stufenförmige Verlauf der kritischen Geschwindigkeiten v_{crit_1} (grüne Linie) weicht insgesamt stärker vom anhand der Krümmung c^* des Flussprofils vorhergesagten Verlauf ab (schwarze durchgezogene). Die Grenze des Phasengebiets der Fallschirmform stimmt im Geschwindigkeitsbereich von 200 $\mu\text{m/s}$ bis ca. 1000 $\mu\text{m/s}$ gut mit der kritischen Krümmung c^* überein (schwarze gestrichelte Linie). Im Mittel stimmt auch der Verlauf von v_{crit_1} mit dem entsprechenden Verlauf von c^* überein, der stufenförmige Verlauf wird allerdings nicht wiedergespiegelt. Weiterhin tritt die Pantoffelform häufig auf im Bereich $7,0 \mu\text{m} < D_{Cap} < 12,0 \mu\text{m}$, bei kleineren Kapillardurchmessern hingegen formt sich der Diskozyt praktisch direkt in die Fallschirmform um.

Um zu überprüfen, ob eine Erhöhung der Diamid-Konzentration die Effekte weiter verstärkt (d.h. die Zellen noch leichter deformierbar werden), wurden im Bereich hoher Wandwechselwirkungen Blutkörperchen untersucht, die mit 40 mM Diamid inkubiert wurden. Hier verschiebt sich sowohl v_{crit_1} (grüne Linie) als auch v_{crit_2} (blaue Linie) zu höheren Geschwindigkeiten. Die Blutkörperchen werden durch eine stärkere Quervernetzung wieder weniger deformierbar. Die im Bereich starker Wandwechselwirkungen auffällige Abnahme von v_{crit_2} ist allerdings auch hier noch zu erkennen.

8.5 Diskussion

Formänderungen elastischer Objekte im Kapillarfluss, wie etwa die der Blutkörperchen, sind kontrolliert durch die Balance von elastischen Eigenschaften des Objekts und den hydrodynamischen Kräften des strömenden Fluides. In Kapitel 5 wurden zwei charakteristische Formänderungen roter Blutkörperchen im Kapillarfluss identifiziert und eingehend untersucht. Es wurden entsprechend zwei unterschiedliche kritischen Geschwindigkeiten definiert, v_{crit_1} für die Formumwandlung von Diskozyt in Pantoffelform und v_{crit_2} für die Formumwandlung von Pantoffelform in Fallschirmform. Da beide kritische Geschwindigkeiten sich in unterschiedlicher Weise mit einer Änderung des Durchmessers der Kapillare ändern, wurde angenommen, dass beide geschwindigkeitsgetriebenen Formumwandlungen auf verschiedene molekulare Mechanismen zurückzuführen sind.

In diesem Kapitel wurden nun durch chemische Modifikationen des Zytoskeletts mögliche molekulare Mechanismen identifiziert, welche die Formänderungen und damit die elastischen Eigenschaften der Blutkörperchen kontrollieren. Dabei dient die Änderung der kritischen Geschwindigkeiten durch die chemischen Modifikationen als Maß für die Änderung der Elastizität bzw. die Deformierbarkeit der Blutkörperchen. Es wurde deutlich, dass weder Formalin noch Diamid die Blutkörperchen pauschal versteift, sondern die Effekte der Chemikalien wiederum deutlich vom Kapillardurchmesser beeinflusst sind. Damit muss zusätzlich zu den beiden molekularen Kontrollmechanismen für die Formumwandlung auch die Bedeutung der zwei geometrischen Regimes

unterstrichen werden. Das eine geometrische Regime ist charakterisiert durch Kapillardurchmesser kleiner als der typische Durchmesser roter Blutkörperchen von 7 μm bis 8 μm und damit verbundenen starken Wechselwirkungen zwischen Blutkörperchen und Kapillarwand. Das andere ist charakterisiert durch eine vergleichsweise geringe räumliche Einschränkung der Blutkörperchen bei Kapillardurchmessern größer als der typische Blutkörperchendurchmesser. In den erstellten Phasendiagrammen ist der Zusammenhang zwischen Kapillargeometrie und Formumwandlung sehr gut am veränderten Verlauf der kritischen Geschwindigkeiten erkennbar (siehe Abbildung 55, Abbildung 56 und Abbildung 57). Weiterhin wird darin der Einfluss beider Chemikalien auf die Formumwandlung der Blutkörperchen im Kapillarfluss deutlich.

Hier werden nun zwei molekulare Mechanismen vorgestellt und im Anschluss ausführlich erläutert, welche das dynamische Verhalten der Blutkörperchen im Kapillarfluss mitsamt der chemisch herbeigeführten Änderungen erklären können. Weiterhin werden die vorgestellten Ergebnisse im Zusammenhang mit anderen dynamischen Phänomenen diskutiert und mögliche physiologische Bedeutungen aufgezeigt.

8.5.1 Molekulare Mechanismen der Formumwandlung im Kapillarfluss

Durch die inter- und intramolekulare Quervernetzung von Spektrin im Zytoskelett roter Blutkörperchen mit Diamid beziehungsweise Formalin konnte deren dynamisches Verhalten im Kapillarfluss gezielt beeinflusst werden. Die Messungen an den chemisch modifizierten Zellen zeigen deutlich, dass die Grenzen der verschiedenen dynamischen Regimes der Formumwandlung sowohl durch unterschiedliche molekulare Mechanismen im Zytoskelett, als auch durch die Kanalgeometrie, in der sie sich bewegen, bestimmt sind. Für beide Formumwandlungen müssen die Blutkörperchen sukzessive zwei unterschiedliche Energiebarrieren überwinden, die hier durch inter- und intramolekulare Quervernetzung des Spektrins gezielt verändert wurden. Im Wesentlichen lassen sich die Ergebnisse der Experimente in einem Modell mit zwei verschiedenen molekularen Mechanismen verstehen, die im Anschluss genauer erläutert werden.

- I. Die Formumwandlung von Diskozyt in die Pantoffelform wird durch die Biegeelastizität und die nichtlineare Entropieelastizität des Spektrins kontrolliert.
- II. Die Formumwandlung von Pantoffelform in Fallschirmform wird durch Networksoftening kontrolliert

Mechanismus I lässt sich besonders durch die oxidative Quervernetzung des Spektrins mit Diamid beeinflussen. Dabei wird die entropische Elastizität des Spektrins herabgesetzt und dessen Biegesteifigkeit erhöht. Mechanismus II lässt sich insbesondere durch die intramolekulare Quervernetzung der Protein-Sekundärstruktur mit Formalin beeinflussen, da dadurch die elastische Auffaltbarkeit von Domänen in Proteinen abnimmt.

Formumwandlung von Diskozyt in Pantoffelform (Mechanismus I)

Da die Entropieelastizität und die Biegesteifigkeit der Spektrine durch die intramolekulare Quervernetzung mit Formaldehyd nur geringfügig beeinträchtigt ist, verhalten sich die formalinbehandelten Zellen bezüglich der Umwandlung von Diskozyt in Pantoffelform sehr ähnlich wie native Blutkörperchen. In dem PDMS-Kanal mit konstantem $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ Querschnitt ändert sich die entsprechende kritische Geschwindigkeit v_{crit_1} nicht signifikant, ebenso sind im Phasendiagramm die Unterschiede zu den nativen Zellen im Bereich $D_{Cap} > D_{RBC}$ gering. Erst bei höheren Geschwindigkeiten werden die Unterschiede im Phasendiagramm größer, wahrscheinlich aufgrund der höheren inneren Viskosität der formalinbehandelten Zellen. Das elastische Verhalten des Blutkörperchens ändert sich auch im statischen Mikropipetten-Experiment vergleichsweise wenig.

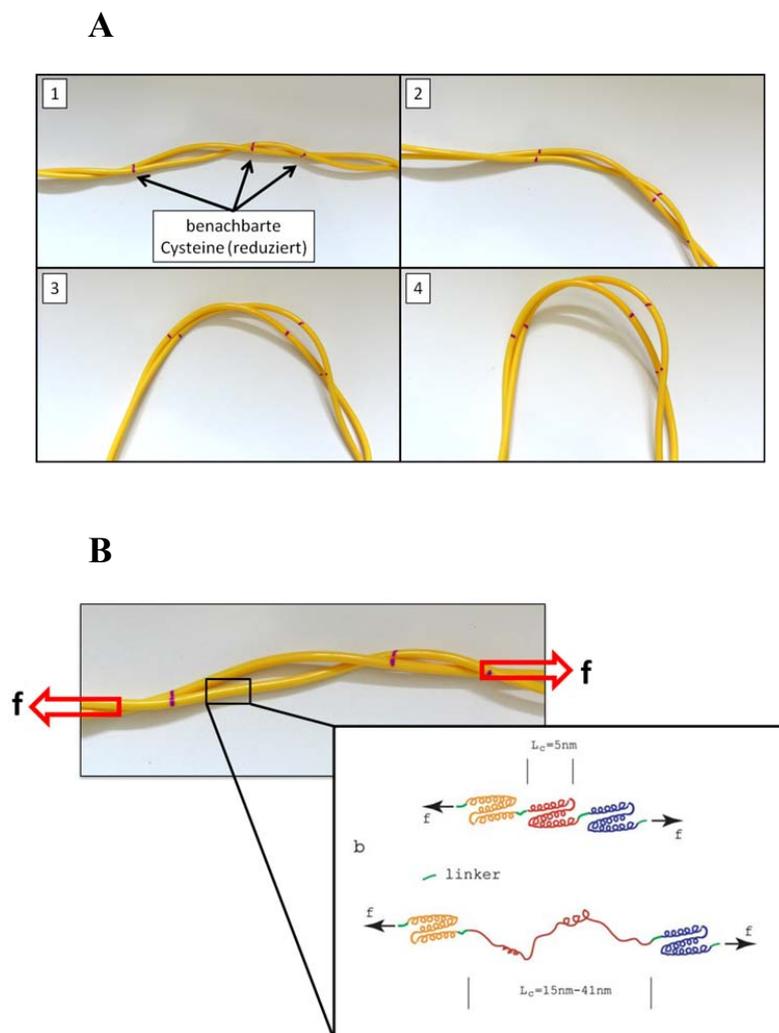


Abbildung 58: Veranschaulichung der chemischen Modifikation durch Diamid mit einem Spektrin-Dimer, dargestellt als gelbes Kabel. A: Die Änderung des Abstands zweier gegenüberliegender Punkte (Cystein-Paare) zueinander bei einer Biegung des Kabels verdeutlicht den versteifenden Effekt auf das Zytoskelett. Wären diese Punkte fest miteinander verbunden, so wäre die Biegung erheblich erschwert. Zudem ist Spektrin an seinen beiden Enden im Zytoskelett fixiert und ein entdrillen ist nicht möglich B: Wird das Zytoskelett über einen bestimmten Schwellenwert gedehnt, so entfalten sich die tripelhelikalen Domänen [144]. Das Entfalten der Domänen wird durch intramolekulare Vernetzung durch Formalin unterbunden.

Diamid hingegen vernetzt die im Spektrin aneinandergelagerten α - und β -Spektrinmoleküle kovalent über kovalent Disulfidbrücken. Mit den Konzepten der Polymerphysik lässt sich verstehen, dass durch die Quervernetzung zum einen die Dehnbarkeit der Spektrine erniedrigt und zum anderen deren Biegesteifigkeit erhöht wird. Spektrin wird zum semiflexiblen Filament. Im Kapillarfluss bewirkt diese veränderte Elastizität insbesondere eine Stabilisierung der diskozytischen Form. Sowohl bei der Messung bei konstantem Kapillarquerschnitt ($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ Kanal) als auch in die Messungen zur Phasenlandschaft in den sich langsam verjüngenden Kapillaren sind Diskozyten bis zu höheren Geschwindigkeiten stabil. Die geringere Auslenkbarkeit der Spektrine durch die Quervernetzung von α - und β -Spektrin erschwert die Scherung des Zytoskeletts, welche für die Umformung des Diskozyten in die Pantoffelform notwendig ist. Entsprechend erhöht sich die kritische Geschwindigkeit $v_{crit,1}$ stark. Die Energiebarriere für diese Art der Deformation wird also durch die intermolekulare Quervernetzung deutlich erhöht. Weiterhin wirkt sich eine erhöhte Biegesteifigkeit besonders auf die Umformung des Diskozyten in die Pantoffelform aus, weil die Pantoffelform an ihrem hinteren Ende lokal stark gekrümmt werden muss. Auch diese Art der Deformation erfordert nach der Diamidbehandlung eine höhere Kraft, als es für native oder formalinbehandelte Zellen der Fall ist (vgl. auch Mikropipetten-Aspiration, Abschnitt 8.4.2).

Formumwandlung von Pantoffelform in Fallschirmform (Mechanismus II)

Zunächst werden die diamidbehandelten Blutkörperchen betrachtet. Während diese bei geringer räumlicher Einschränkung noch deutlich steifer sind als native Blutkörperchen, so werden sie bei kleinen Kapillardurchmessern deutlich weicher. Um kleine Kapillaren nicht zu verstopfen, besitzen die oxidativ geschädigten Blutkörperchen offensichtlich einen Mechanismus, der deren Versteifung kompensieren kann: das Networksoftening. Sobald die Blutkörperchen den Bereich $D_{Cap} \approx D_{RBC}$ erreichen, erhöht sich die Reibung zwischen Blutkörperchen und Kapillarwand stark. Hier zeigt der Verlauf von $v_{crit,1}$ im Experiment einen signifikanten Knick. Die kritische Geschwindigkeit $v_{crit,1}$ sinkt mit abnehmendem Kapillardurchmesser plötzlich ab und das Blutkörperchen wird deutlich weicher bzw. elastischer. Weiterhin ist in diesem Bereich auch die kritische Geschwindigkeit $v_{crit,2}$ zur Umwandlung in die Fallschirmform um etwa $400\ \mu\text{m/s}$ erniedrigt, im Vergleich zu nativen Blutkörperchen. Im Experiment wandelt sich hier der Diskozyt praktisch direkt in die Fallschirmform um. Diamidbehandelte Zellen zeigen damit ein sehr ausgeprägtes Networksoftening im Bereich starker Wandwechselwirkungen. Vermutlich spielt hierfür die Panzerkettenbewegung der Membran (da die Membran um das Zytosol rotiert, kommt nahezu jedes Gebiet der Membranoberfläche in Kontakt mit der Wand) und die Glykokalix eine wichtige Rolle. Die Glykokalix kann über die integralen Proteine die außen angreifenden Kräfte direkt an das Zytoskelett weiterleiten, ähnlich wie die Haarzellen des Gleichgewichtsorgans als Lagesensoren in der Ohrschnecke fungieren. Was hier genau das Networksoftening verursacht, kann aus den Experimenten nicht mit letzter Bestimmtheit entschieden werden. Mit hoher Sicherheit spielt hier das Auffalten von Proteindomänen eine Rolle, aber auch das Abreißen nicht-kovalenter Bindungen,

etwa in der Mitte des Spektrins an der Kopf-zu-Kopf Verknüpfung oder an den Andockstellen des Aktins, ist möglich.

In der Mikropipetten-Messung ist ebenfalls ein Networksoftening-Phänomen zu beobachten [71], [174]. In der Anfangsphase der Messung muss das Zytoskelett vor allem um die Mündung in die Pipette gebogen werden. Hier verhalten sich die diamidbehandelten Zellen deutlich steifer als native oder formalinbehandelte Blutkörperchen, es sind mehr als zwei Größenordnungen höhere Ansaugdrücke nötig, um das Networksoftening zu aktivieren. Die Membran wird dann auch in diesem Fall deutlich elastischer bzw. dehnbarer, sobald die Länge D_p des eingesaugten Membranstückes größer ist als der Pipettendurchmesser $2R_p$ und die Membran flächigen Kontakt zur Pipetten-Innenwand hat. Erst dann wird die Membran durch Networksoftening deutlich elastischer, wenn der Druck weiter erhöht wird [71].

Die formalinbehandelten Zellen hingegen besitzen bei kleinen Kapillardurchmessern eine deutlich erhöhte kritische Geschwindigkeit $v_{crit,2}$, da das Networksoftening durch die chemische Modifikation erschwert wird. Formalin vernetzt Proteine intramolekular und konserviert deren Sekundärstruktur. Eine Auffaltung ("Schmelzen") von Domänen in der Protein-Sekundärstruktur wird dadurch unterbunden. Für die Experimente wurde eine sehr niedrige Formalinkonzentration gewählt, sodass die Proteine nicht vollständig intramolekular quervernetzt sind und das Networksoftening damit nicht vollständig unterbunden wird. Bei hohen Geschwindigkeiten sind daher Fallschirmformen zu beobachten.

Für Kapillaren mit $D_{cap} > D_{RBC}$ ist für diamidbehandelte Zellen $v_{crit,2}$ höher als für formalinbehandelte Zellen. Auf die Membran wirken in diesem Regime vergleichsweise geringe Reibungskräfte, die offenbar erst bei Geschwindigkeiten über 3000 $\mu\text{m/s}$ ausreichen, um das Networksoftening zu aktivieren und die Umwandlung in die Fallschirmform zu erlauben. Beide chemische Modifikationen wirken sich hier in die gleiche Richtung aus, wobei die Diamid-Modifikation offensichtlich einen stärkeren Effekt hat.

Ankyrin - eine weitere Nanofeder im Zytoskelett

Bei niedrigen Geschwindigkeiten (unter 200 $\mu\text{m/s}$) und Kapillardurchmessern $D_{cap} < D_{RBC}$ zeigen diamid- und formalinbehandelte Blutkörperchen sehr ähnliche Effekte. Die diskozytische Form ist in beiden Fällen stabiler. Für die diamidbehandelten Zellen kann dies allein aus der intermolekularen Quervernetzung gut verstanden werden, da das Auffalten der Domänen im Spektrin nur kooperativ (also synchron für die aneinander gepinnten α - und β -Ketten) erfolgen kann. Daher ist die dafür benötigte Kraft höher als in nativen Zellen. Die Pantoffelform mit ihrer starken lokalen Krümmung und der Panzerkettenbewegung ist dabei ebenso energetisch ungünstig. Für die formalinbehandelten Blutkörperchen ist allerdings nicht einfach ersichtlich, warum $v_{crit,1}$ bei kleinen Kapillardurchmessern erhöht ist bei der Annahme, dass die nichtlineare, entropische Elastizität die Formumwandlung von Diskozyt in den Slipper reguliert. Möglicherweise ist in kleinen Kapillaren auch für die Bildung der Pantoffelform das Networksoftening notwendig. Eine andere mögliche Erklärung liefert ein weiteres wichtiges Protein, Ankyrin, welches ebenso wie Spektrin, die Funk-

tion einer Nanofeder im Zytoskelett hat [6]. Ankyrin ist, analog zu Spektrin, aus antiparallelen aneinandergelagerten α -Helices aufgebaut, die sich unter Last entfalten [206]. Ankyrin koppelt Spektrin also elastisch¹¹ an die Plasmamembran und ist ebenso empfindlich für Modifikation durch Formalin. Da sich bei der Panzerkettenbewegung die lokale Krümmung der Membran kontinuierlich ändert und sich das Zytoskelett ständig (lokal) relativ zur Plasmamembran verschieben muss, erschwert eine verringerte Elastizität von Ankyrin womöglich die Bildung der Pantoffelform. Die Rolle von Ankyrin für das elastische Verhalten (intakter) roter Blutkörperchen ist allerdings bisher nur wenig untersucht und verstanden.

Erhöhung der inneren Viskosität durch chemische Modifikation

In der biochemischen Analyse der Proteinmodifikationen (Gelelektrophorese) sind sowohl bei diamidbehandelten Zellen als auch bei formalinbehandelten Zellen große Proteinaggregate zu finden. Sind solch Proteinaggregate durch Quervernetzung zytosolischer Proteine entstanden, so führt dies etwa zu einer erhöhten Viskosität im Zellinneren. Auswirkungen auf das dynamische Verhalten der Blutkörperchen, die auf eine erhöhte Viskosität durch Proteinquervernetzung im Zytosol schließen lassen, zeigen allerdings nur die formalinbehandelten Zellen. Bei diesen weichen die Grenzen der Formen-Gebiete in der Phasenlandschaft bereits bei vergleichsweise geringen Geschwindigkeiten, nämlich über etwa 700 μm , stärker von den aus der Krümmung des Flussprofils extrapolierten Werten ab. Dies beruht vermutlich auf einer verlangsamten Relaxation in die jeweilige dynamische Form. Diese vermutete Erhöhung der Viskosität stimmt mit Berichten aus der Literatur überein [179] [83]. Die großen Proteinaggregate in den diamidbehandelten Zellen sind daher vermutlich auf Quervernetzung von Spektrin oder auf Quervernetzung integraler Proteine wie Bande 3 zurückzuführen, denn diese wirken sich in en Experimenten offensichtlich nicht auf das viskose Verhalten der Blutkörperchen aus.

Modell für das makroskopische, elastische Verhalten

Fasst man die chemischen Modifikationen in einem vereinfachten, makroskopischen Modell zusammen, ergibt sich folgendes Bild. Das entropische Netzwerk verhält sich im Kapillarfluss nur für kleine elastische Verformungen linear. Das Schermodul nativer Blutkörperchen nimmt zunächst mit zunehmender Scherung zu [65], [66]. Oberhalb einer kritischen Belastung werden die entropischen Federn des Zytoskeletts instabil und es tritt ein Networksoftening auf (vgl. auch Abbildung 48 und Kapitel 8.3). Für die intermolekulare Quervernetzung im Zytoskelett durch Formalin ist das Schermodul für kleine elastische Verformungen nicht oder nur gering etwas erhöht. Allerdings ist das Networksoftening erschwert bzw. völlig unterbunden. Für die intermolekulare Quervernetzung im Spektrin durch Oxidation von Thiolen zu Disulfidbrücken ist zunächst das Schermodul gerade auch für kleine Scherungen erhöht, oberhalb einer kritischen Scherung (entsprechend v_{crit_2} für Diamid) ist aber Networksoftening dennoch möglich und wird im Kapillarfluss bei starken Wand-

¹¹ Das elastische Verhalten von Ankyrin ist dabei nicht stark nichtlinear wie das von Spektrin, sondern für relevante Auslenkungen linear [206].

wechselwirkungen im Vergleich zu nativen Blutkörperchen bereits bei einer niedrigeren Geschwindigkeit beobachtet. Im hydrodynamischen Fluss ist für Kapillargeometrien $D_{Cap} < D_{RBC}$ mit starken Wandwechselwirkungen die kritische Scherung, bei der das Networksoftening einsetzt, sogar niedriger als bei nativen Zellen.

Abschätzung der Änderung mechanischer Eigenschaften durch intermolekulare Quervernetzung anhand der Polymerphysik

Für die diamidbehandelten Zellen kann die Änderung der Biegesteifigkeit durch Quervernetzung von Spektrin vereinfacht als Änderung des Molekülradius verstanden werden (vgl. Abschnitt 8.3). Nimmt man den Extremfall an, dass die intermolekulare Quervernetzung von α - und β -Spektrin durch Diamid einer Verdopplung des Polymerradius entspricht (beide Monomere sind helikal umeinander gewunden vgl. Abbildung 59), lässt sich die Änderung der Biegesteifigkeit aus Gl. 48 wie folgt berechnen. Für ein natives Spektrin-Monomer wird ein Polymerradius von 2 nm angenommen¹² und für das E-Modul ein Wert von $3 \cdot 10^6 \text{ J/m}^3$ [207]. Dieser Wert wurde für Spektrin in Haarzellen gefunden und liegt deutlich unterhalb der typischen Werte des E-Moduls von Biopolymeren, ist aber für das sehr flexible Spektrin in Blutkörperchen durchaus realistisch. Für die Biegesteifigkeit ergibt sich $\kappa_f = J \cdot Y = \left[\frac{1}{4} \cdot \pi \cdot (2 \cdot 10^{-9} \text{ m})^4 \right] \cdot \left(\frac{3 \cdot 10^6 \text{ J}}{\text{m}^3} \right) \approx 3,8 \cdot 10^{-29} \text{ Jm}$. Aus dieser Biegesteifigkeit berechnet sich eine Persistenzlänge $\xi_p = \frac{\kappa_f}{k_B T} \approx 10 \text{ nm}$, die experimentell bestimmten Werten entspricht [60]. Gegenüber elektronenmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abbildung 59) werden hier größere Polymerradien eingesetzt, die daraus errechnete Persistenzlänge stimmt jedoch sehr gut mit den experimentellen Literaturwerten überein. Setzt man nun den doppelten Polymerradius von 4,0 nm ein, so ergibt sich für die Biegesteifigkeit $\kappa_f^{2r} = 6 \cdot 10^{-28} \text{ Jm}$. Mit dieser Abschätzung erhöht sich die Persistenzlänge von Spektrin durch die intermolekulare Quervernetzung um mehr als zwei Größenordnungen auf $\xi_p \approx 150 \text{ nm}$. Die Persistenzlänge liegt damit in einer ähnlichen Größenordnung wie die Konturlänge von 200 nm und das modifizierte Spektrin muss nun als semiflexibles Stäbchen betrachtet werden. Ein ähnliches Phänomen hat die Natur für DNA umgesetzt, auch hier findet man vergleichbare Unterschiede in der Persistenzlänge zwischen doppelsträngiger DNA von $\xi_{DNA} \approx 50 \text{ nm}$ [60] und der Persistenzlänge einsträngiger RNA von $\xi_{RNA} \approx 1 - 2 \text{ nm}$ [208]. Man muss hier allerdings im Auge behalten, dass sich trotz Erhöhung der Persistenzlänge durch die Quervernetzung mit Diamid das Spektrin nicht streckt, es bleibt ein stark verbogenes, aber semiflexibles Filament. Die hier durchgeführte Abschätzung zeigt also, dass die Persistenzlänge der diamid-quervernetzten Spektrine beinahe ebenso groß wird, wie die Konturlänge des Moleküls. Entsprechend wird das Polymer-Modell zum entropieelastischen

¹² Der Radius des Protein-Rückgrades (ohne Seitenketten) beträgt etwa 0,3 nm, für den α -Helix-Radius kann man etwa 1 nm abschätzen. Die Monomere sind im Spektrin zu Tripelhelices aneinander gelagert, was den effektiven Polymerradius weiter erhöht auf etwa 4-5 nm. Die "Kettengelenke" im Spektrin besitzen keine helikale Struktur, der effektive Radius des Polymers liegt daher vermutlich zwischen dem Radius eines einfachen Peptids und dem der tripelhelikalen Kettensegmente.

Verhalten von Spektrin ungültig und Spektrin verhält sich praktisch nicht mehr wie eine entropische Feder. Diese berechnete Änderung der Persistenzlänge verdeutlicht damit auch, dass durch die Diamidbehandlung für die Streckung des Spektrins (Erhöhung des End-zu-End Abstandes) andere molekulare Kräfte überwunden werden müssen, die sich z.B. durch feste Bindungswinkel und sterische Effekte gegeben sind.

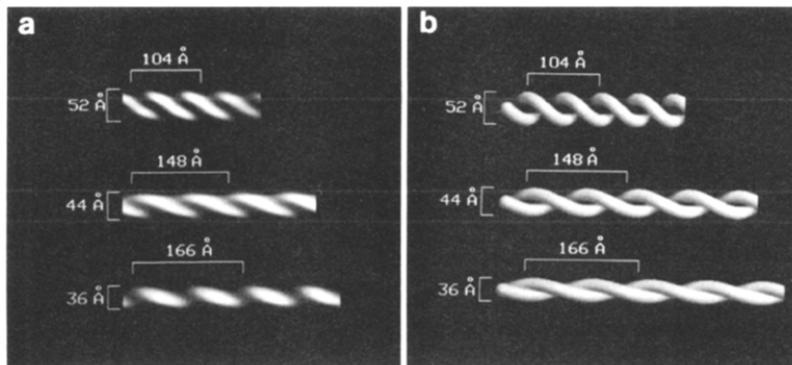


Abbildung 59: Elektronenmikroskopische Untersuchung zur räumlichen Anordnung von Spektrin. Gefiltertes, elektronenmikroskopisches Bild (a) und daraus konstruiertes Modell (b), aus [114]. Durchmesser und Steigung der umeinander gewundenen Spektrinmoleküle sind eingezeichnet.

Will man nun aus der Biegesteifigkeit der einzelnen Spektrine die Biegesteifigkeit der gesamten Fläche des Zytoskeletts abschätzen, berücksichtigt man den mittleren Abstand d zwischen den Spektrinen, der der Seitenlänge a eines Einheitslements $d = a = 70 \text{ nm}$ entspricht. Daraus ergibt sich $\kappa_A = k_f/d = 5,4 \cdot 10^{-22} \text{ J}$ für native Blutkörperchen und $\kappa_A = 8,5 \cdot 10^{-21} \text{ J}$ für die Abschätzung der diamidbehandelten Blutkörperchen. Beide Werte liegen deutlich unterhalb der Biegesteifigkeit der Plasmamembran (mit $\kappa \approx 1 \cdot 10^0 - 19 \text{ J}$), deshalb wird hier davon ausgegangen, dass der Einfluss von Diamid-Quervernetzung auf die Gesamt-Biegesteifigkeit der Membran hier einen kleineren Einfluss hat, als die Änderungen des Schermoduls μ durch die chemischen Modifikationen. Allerdings wird die charakteristische Längenskala $\Lambda_{el} = \sqrt{\kappa/\mu}$ (Gl. 21, siehe auch Kapitel 4.4) verändert, unterhalb der die Biegeelastizität das Verhalten der Blutkörperchen dominiert. Damit lässt sich verstehen, dass für die diamidbehandelten Blutkörperchen v_{crit_1} und v_{crit_2} sich für $D_{Cap} > D_{RBC}$ besonders stark erhöht.

Morphologie und das relative Verhältnis von Scherung und Biegung

Anhand der Eigenschaften des Spektrins und dem typischen Verhalten von Polymeren wird deutlich, dass sich das Schermodul der Membran der Blutkörperchen mit der Scherbelastung ändert. Das relative Verhältnis von Biegeelastizität und Scherelastizität dünner Schalen hat einen Einfluss auf die Morphologie der Schalen, wie auch in Kapitel 7 diskutiert und in Kapitel 4 anhand der

Morphologie von Echinozyten verdeutlicht wurde. Für dynamische Systeme gilt ebenso, dass die Membran umso schwerer lokal stark gekrümmt werden kann, je kleiner das Schermodul im Verhältnis zur Biegesteifigkeit ist. Und desto geringer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Membran Knicke oder Furchen ausbildet [83] [209]. Ändert sich dieses dynamische Verhalten des Schermoduls, so sollte sich als Folge auch die Tendenz der Membran, Furchen und Knicke auszubilden, ändern, verglichen mit nativen roten Blutkörperchen. Sowohl für diamidbehandelte Blutkörperchen als auch für formalinbehandelte Blutkörperchen werden häufiger geknickte Formen unter verschiedenen Bedingungen beobachtet. Dies soll hier nur am Rande erwähnt sein, eine quantitative Auswertung dieses Verhaltens erfolgt im Rahmen nachfolgender Arbeiten.

Bereits Fischer beobachtete, dass mit Diamid versteifte Blutkörperchen im linearen Scherfeld Furchen auf der Membran, parallel zur Flussrichtung und senkrecht zur Richtung der Kompression der Membran, ausbilden [83]. Die Furchen verschwinden bei Erhöhung der Scherrate. Erhöht Diamid das Schermodul stärker als die Biegesteifigkeit, sollten vermehrt geknickt oder gefurchte Formen zu beobachten sein. Im Rahmen der hier aufgestellten Arbeitshypothese verhindert insbesondere Formalin, dass sich das Schermodul der Membran der Blutkörperchen bei hoher Scherbelastung wieder erniedrigt. Daher sind oberhalb der kritischen Geschwindigkeit v_{crit_2} vermehrt gefurchte und geknickte Formen roter Blutkörperchen zu beobachten.

Den Zusammenhang zwischen der relativen Asphärizität dünner Schalen beschreibt auch die dimensionslose Föppel von Karman Zahl, die besonders in der Beschreibung viraler Kapside verwendet wird. Rote Blutkörperchen sind mit einer Föppel von Karman Zahl von 400 knapp oberhalb des kritischen Werts, der den Übergang von glatten runde Formen zu geknickten Formen (*buckling transition*) [90]. Daher kann man annehmen, dass das Schermodul relativ zum Biegemodul nur wenig erhöht werden muss, um anstatt glatter, runder Blutkörperchen-Oberflächen häufiger geknickte oder faltige Formen zu beobachten.

8.5.2 Mögliche physiologische Bedeutung

Ganz allgemein erleichtern weiche, deformierbare Blutkörperchen den Blutfluss und stellen so die optimale Versorgung des Gewebes sicher. Eine verminderte Deformierbarkeit erhöht die Blutviskosität und somit die Belastung des Herz-Kreislaufsystems, mögliche Folgeerscheinungen sind unter anderem Bluthochdruck und eine verschlechterte Sauerstoff-Versorgung des Gewebes [210].

Echte Blutgefäße vs. künstliche Kapillaren

Will man die Experimente mit der physiologischen Umgebung der Blutkörperchen vergleichen, so muss berücksichtigt werden, dass der effektive Querschnitt von Kapillaren im Körper aufgrund der Glykokalix der Blutgefäßwände kleiner ist als der tatsächlich im Mikroskop abgebildete Querschnitt [153], [211], [212]. Zudem sind Adern elastische Blutgefäße, was auf PDMS nicht im selben Maße zutrifft. Daher sind die hier ermittelten Zusammenhänge zwischen Radius, Flussge-

schwindigkeit und kritischer Geschwindigkeit der Formumwandlung sicher nicht exakt quantitativ, aber sicherlich qualitativ auf das physiologische System übertragbar. Auch *in vivo* treten sowohl Pantoffel- und Fallschirmförmige Blutkörperchen in engen Blutgefäßen auf [154].

Zusammenhang mit ATP-Freisetzung roter Blutkörperchen

Eine wichtige physiologische Funktion roter Blutkörperchen ist die Freisetzung von ATP im Blutkreislauf, sie tragen so zur Regulierung des Blutdruckes bei [19]. Forsyth et al. konnten das dynamische Verhalten einzelner Blutkörperchen sowohl mit dieser physiologischen Funktion (ATP-Freisetzung) als auch mit einem makroskopischen Phänomen in Zusammenhang bringen [137]. Demnach ist der Übergang von Taumel- zu Panzerkettenbewegung im linearen Scherfluss mit der Abnahme der Blutviskosität bei zunehmender Scherrate (*Shear Thinning*) und der deutlichen Zunahme der ATP-Freisetzung korreliert. Alle drei Phänomene treten bei einem ähnlichen Scherstress $\sigma \approx 6,5 Pa$ auf. In den Kapillaren wirkt ein vergleichbarer Scherstress $\sigma = \frac{v_{RBC}}{z} \cdot \eta = 6,5 Pa$ etwa bei einer Geschwindigkeit $v_{RBC} = 650 \mu m/s$ und einem mittleren Wandabstand $z = 0,1 \mu m$ auf die roten Blutkörperchen und stimmt damit beispielsweise im Bereich von $D_{Cap} \approx D_{RBC}$ mit $v_{crit,2}$ überein. Diese Korrelation legt also nahe, dass auch im Kapillarfluss die Formumwandlung nicht allein zur Verringerung des Strömungswiderstandes dient, sondern vermutlich auch eine einer erhöhten ATP-Freisetzung der roten Blutkörperchen bewirkt.

Auch die ATP-Freisetzung reagiert sensitiv auf oxidative Schäden durch Diamid. Von Wan et al. wurde die ATP-Freisetzung roter Blutkörperchen im hydrodynamischen Fluss genauer untersucht. Er findet für die scherinduzierte ATP-Freisetzung einen Mechanismus, der eine Mindestdauer der Deformation (Scherung) erfordert. Werden die Blutkörperchen nur sehr kurz (im Bereich von Millisekunden) ausreihend hohen Scherkräften ausgesetzt, so erhöht sich die ATP-Ausschüttung nicht. Dauert sie Scherung lange genug an, tritt wiederum zeitlich verzögert die erhöhte ATP-Ausschüttung ein [23]. Als möglicher molekularer Mechanismus wird die laterale Diffusion des integralen Proteins CFTR zu Aktin angenommen. Die Wechselwirkung von CFTR und Aktin gilt als Ursache für die Freisetzung von ATP. Eine Versteifung der Blutkörperchen mit Diamid verringerte die Menge des freigesetzten ATPs. Auch in diesem Zusammenhang wird deutlich, dass oxidative Schäden für Zellen eine starke Beeinträchtigung darstellen können. Ein verlässlicher Mechanismus, diese zu erkennen und zu eliminieren, ist überaus wichtig.

Spektrin als Sensor für oxidative Schäden und Zellalterung

Zellen sind ständig reaktiven Oxidantien ausgesetzt, die ähnlich wie Diamid, Proteine schädigen. Ein effektiver „Sensor“ für solche Schäden scheint daher für Blutkörperchen sinnvoll und notwendig. Der Großteil der Thiole im Spektrin ist naturgemäß so nahe beieinander positioniert, dass sie leicht zu Disulfidbrücken oxidiert werden können. Je mehr oxidative Schäden auftreten, desto weniger deformierbar wird das Blutkörperchen. In der Milz müssen sich die Blutkörperchen durch winzigste Verengungen quetschen. Sind sie zu wenig deformierbar, so bleiben sie stecken, platzen und werden von Makrophagen recycelt. Zudem ist bekannt, dass durch Diamid (bzw. oxidative

Schäden im Allgemeinen) Blutkörperchen fragiler werden, vermutlich aufgrund einer Destabilisierung des Spektrin-Aktin-Bande 4.1 Komplexes. Sie platzen daher leichter und werden schnell in der Milz aus der Blutbahn entfernt [183] [168] [201].

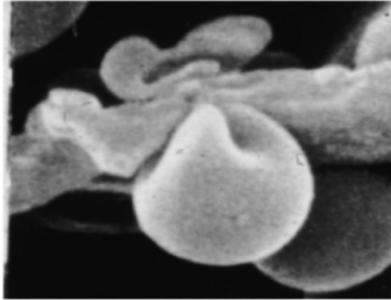


Abbildung 60. Elektronenmikroskopische Abbildung eines Blutkörperchens, das sich durch das poröse Gewebe der Milz quetscht, entnommen aus [10]. Alte, steife Zellen platzen hier und werden von Makrophagen recycelt.

Besonders anfällig für oxidative Schäden ist auch Bande 3 (vgl. Ergebnis der Gelelektrophorese für Diamid behandelte Blutkörperchen). Als Anionentransporter für HCO_3^- erfüllt dieses Transmembranprotein die lebenswichtige Aufgabe, Kohlendioxid ins Zellinnere zu transportieren und damit dessen Abtransport in die Lunge zu gewährleisten. Während im Zytosol und auch im Blutplasma hohe Konzentrationen an GSH oxidative Schäden an Thiolen abfangen und Vitamin E (Tocopherol) Lipidperoxidation in der Plasmamembran verhindert, hat die Zelle im dicht gedrängten Bereich zwischen Zytoskelett und Plasmamembran offenbar keinen wirksamen Mechanismus, der die Oxidation von Thiolen verhindert oder repariert. Auch das verdeutlicht, wie überaus sinnvoll ein verlässlicher Sensor für derartige oxidative Schäden ist [195].

Und schließlich kann man weiter spekulieren dass die gesundheitsfördernde Wirkung verschiedener schwefelhaltiger Naturstoffe, z.B. die nachweislich blutdrucksenkende Wirkung von Knoblauch, mit dem beschriebenen Mechanismus in Zusammenhang steht. Diese natürlichen Thiole könnten als zusätzlich vorhandene oxidierbare Substanzen die schädliche Bildung von Disulfidbrücken, u.a. in den Proteinen des Zytoskeletts, verhindern und somit zur Gesunderhaltung des kardiovaskulären Systems beitragen.

8.6 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde die Auswirkung chemischer Modifikationen auf das Verhalten roter Blutkörperchen im Kapillarfluss untersucht. Bei formalinbehandelten Zellen ist die kritische Geschwindigkeit v_{crit_2} bei der Formumwandlung von Pantoffelform in die Fallschirmform stattfindet, im gesamten untersuchten Bereich $4 \mu\text{m} < D_{Cap} < 18 \mu\text{m}$ deutlich erhöht. Die kritische Geschwindigkeit v_{crit_1} der Formumwandlung von Diskozyt in Pantoffelform ist nur in dünnen Kapillaren mit $D_{Cap} < D_{RBC}$ stark erhöht. Für diamidbehandelte Zellen dagegen ist v_{crit_1} im gesamten untersuchten Bereich stark erhöht und v_{crit_2} ist für $D_{Cap} < D_{RBC}$ sogar niedriger als in nativen Zellen. Diamidbehandelte

Blutkörperchen werden im Kapillarfluss also weicher, wenn sie die Kapillarwand berühren und hohe Reibungskräfte auf die Membran wirken. Damit lässt sich verstehen, dass je nach verwendeter Messmethode Diamid membranversteifend wirkt oder nicht.

Das veränderte Verhalten im Kapillarfluss kann im Wesentlichen durch zwei verschiedene molekulare Mechanismen des Zytoskeletts erklärt werden. Bei einer Scherung der Membran nativer Blutkörperchen wird zunächst das aufgrund der Entropie gewellte Spektrin gestreckt, was durch eine intermolekulare Quervernetzung von α - und β -Spektrin mit Diamid eine höhere Kraft erfordert. Dies kontrolliert insbesondere die Formumwandlung von Diskozyt in Pantoffelform. Wird die Membran stärker geschert, tritt Networksoftening ein und es werden Domänen des Spektrin entfaltet. Dies wird durch intramolekulare Quervernetzung durch Formalin unterbunden und ist besonders für die Umwandlung in die Fallschirmform von Bedeutung.

Um diese Mechanismen genauer detaillierter zu verstehen, ist die Biochemie für eine spezifische, ausführliche Analytik der chemisch modifizierten Proteine und veränderten Proteinwechselwirkungen gefragt, die die Biophysik alleine nicht leisten kann. Aber auch typische biophysikalische Messungen an einzelnen Molekülen, wie etwa Kraftspektroskopie mit AFM oder optischen Pinzetten an chemisch modifizierten Spektrin-Tetrameren, würden hier sicherlich helfen, spezielle kraftabhängige Mechanismen im Zytoskelett genauer aufzuklären.

Um die Ergebnisse letztlich auch auf das Verhalten roter Blutkörperchen in ihrer physiologischen Umgebung übertragen zu können, ist es vor allem interessant, den Einfluss der Glykokalix genauer zu untersuchen. Eine Glykokalix befindet sich sowohl auf der Außenseite der roten Blutkörperchen selbst, als auch die auf der Innenseite der Blutgefäße als dicke, molekulare Schicht. Letztere beeinflusst nachweislich den effektiven Radius der Blutgefäße. Und weiterhin würde ein Nachweis der vermuteten Korrelation zwischen Formumwandlung im Kapillarfluss und der ATP-Freisetzung eine wichtige physiologische Funktion, auch im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten, aufzeigen.

9 Abschließende Diskussion und Ausblick

"With every beat of the heart, inflation of the lung or peristalsis of the gut, cell types of diverse function are subjected to substantial stretch. Stretch is a potent stimulus for growth, differentiation, migration, remodelling and gene expression. [...] (latest) results support the idea that the cell interior is at once a crowded chemical space and a fragile soft material in which the effects of biochemistry, molecular crowding and physical forces are complex and inseparable, yet conspire nonetheless to yield remarkably simple phenomenological laws." Trepap, Deng, An, 2007 [213]

Der Blutkreislauf ist ein überlebenswichtiges System im menschlichen Körper. Mit seinem weitverzweigten Kapillarsystem versorgt er den Stoffwechsel jeder einzelnen Körperzelle. Die Fließeigenschaften des Blutes, und damit die Versorgung des gesamten Organismus, werden maßgeblich durch die Eigenschaften der roten Blutkörperchen beeinflusst, denn sie nehmen mit ca. 45% den größten zellulären Volumenanteil des Blutes ein. Der Stoffaustausch zwischen Blut und dem Gewebe findet dabei in den nur ca. 4 bis 10 μm breiten Kapillargefäßen statt. Daher hilft ein möglichst genaues Wissen und Verständnis für das Verhalten roter Blutkörperchen im Kapillarfluss, um verschiedenste physiologische Vorgänge sowie Krankheiten verstehen zu können. Motiviert durch diese Aspekte wurden in dieser Arbeit rote Blutkörperchen in künstlichen Kapillaren untersucht und die beobachteten Phänomene mit mechanischen und molekularen Modellen erklärt.

Rote Blutkörperchen selbst sind äußerst elastische Membranhüllen, die ein hämoglobinhaltiges Flüssigkeitsvolumen umschließen. Die Membran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, der Plasmamembran, und einem darunter liegenden Proteinnetzwerk, dem Zytoskelett. In der Physik lassen sich Blutkörperchen im Rahmen der Mechanik als geschlossene, elastische Schalen beschreiben. Viele Verhaltensweisen lassen sich gut mit kontinuummmechanischen Ansätzen erklären, während für andere Beobachtungen besser molekulare Modelle herangezogen werden, um die Eigenschaften der Blutkörperchen zu verstehen. Auch die statistische Thermodynamik, die eine Brücke zwischen universellen, makroskopischen Phänomenen und den (quanten-)mechanischen Eigenschaften molekularer Bausteine darstellt, liefert wertvolle Werkzeuge zur Beschreibung des Verhaltens roter Blutkörperchen im Kapillarfluss.

Rote Blutkörperchen besitzen eine ausgeprägte Mikro- und Nanostrukturierung, die sich sehr anschaulich im Elektronenmikroskop (*Scanning Electron Microscope, SEM*) abbilden lässt. Diese Strukturierung steht mit verschiedenen funktionellen und mechanischen Eigenschaften roter Blut-

körperchen im Zusammenhang und wird daher in Kapitel 4 insbesondere nach anschaulichen, qualitativen Gesichtspunkten erläutert

Die weiteren Kapitel dieser Arbeit beschäftigen sich mit dem dynamischen Verhalten roter Blutkörperchen im Kapillarfluss, das im Lichtmikroskop anhand Hochgeschwindigkeits-Videoanalysen untersucht wird. Es werden allgemeine Konzepte der statistischen Thermodynamik verwendet, um die (statistisch verteilte) Häufigkeit der typischen Blutkörperchenformen (Diskozyt, Pantoffelform und Fallschirmform) ganzer Blutkörperchenpopulationen im Kapillarfluss zu beschreiben (Kapitel 5). Dies geschieht sowohl zeitabhängig als auch kraftabhängig bzw. geschwindigkeitsabhängig. Ersteres beschreibt, wie schnell Blutkörperchen in eine neue Gleichgewichtsform bei konstanter Geschwindigkeit relaxieren, letzteres wie stark sich dieses Relaxationsverhalten mit der Flussgeschwindigkeit ändert.

Aus der geschwindigkeitsabhängigen Verteilung der verschiedenen Formen lässt sich jeweils eine kritische Geschwindigkeit für die Formumwandlung von Diskozyt in Pantoffelform sowie von Pantoffelform in Fallschirmform definieren. Ein wichtiges Ergebnis hierbei ist, dass die Pantoffelform ebenso wie Diskozyt und Fallschirmform eine stabile dynamische Form ist. Weiterhin wird ein Phasendiagramm für die verschiedenen Blutkörperchenformen in Abhängigkeit vom Kapillardurchmesser und der Flussgeschwindigkeit der Blutkörperchen erstellt, das den Verlauf beider kritischen Geschwindigkeiten enthält (Kapitel 5).

Die Formumwandlung nativer roter Blutkörperchen im Kapillarfluss lässt sich mechanisch aus der Balance zwischen den elastischen Membraneigenschaften (Biegesteifigkeit und Schermodul) und den hydrodynamischen Kräften des strömenden Fluides verstehen (Kapitel 5) [90], [131]. Im $v_{RBC} - D_{Cap}$ - Phasendiagramm trennt der kritische Parameter $c^* \equiv \frac{2v_0}{R^2} \approx 60 \text{ (s} \cdot \mu\text{m)}^{-1}$, der die Charakteristika des Poiseuille-Profiles beschreibt, das Gebiet der Diskozyten vom Gebiet der Fallschirmform. Die Pantoffelform tritt etwa um den Verlauf von c^* auf, wobei diese besonders in kleinen Kapillaren ($D_{Cap} < D_{RBC}$, starke Wandwechselwirkungen) für höhere Geschwindigkeiten stabilisiert ist. Entsprechende Phasendiagramme werden analog auch für chemisch versteifte Blutkörperchen erstellt und diskutiert (Kapitel 8).

Wie das Verhältnis von elastischen Membraneigenschaften zu hydrodynamischen Kräften das Verhalten roter Blutkörperchen beeinflusst, wird besonders in Mikrokanälen mit sinusförmig oszillierender Breite deutlich (Kapitel 6). Mit der Breite des Kanals oszillieren praktisch auch die hydrodynamischen Kräfte. Sind sie insgesamt zu gering, um die Membran der Blutkörperchen elastisch zu verformen, behält das Blutkörperchen eine konstante ovale bzw. pantoffelförmige Form und oszilliert synchron zum Fluss um einen mittleren Anstellwinkel. Sind die hydrodynamischen Kräfte groß genug, um das Blutkörperchen zu verformen, so oszillieren Länge und Breite der symmetrisch im Flussfeld liegenden Blutkörperchen.

Weiterhin konnte auch das Relaxationsverhalten von fallschirmförmigen Blutkörperchen in ihre bikonkave Ruheform mit Kontinuummechanischen Modellen erklärt werden (Kapitel 7). Die Blutkörperchen relaxieren hier in zwei Stufen. Zunächst beobachtet man eine Formrelaxation als "Öffnung" der Fallschirmform. Diese ist durch die Energie angetrieben, die durch die zentrosym-

metrische Deformation (Scherung) der Blutkörperchen zur Fallschirmform im Zytoskelett gespeichert ist. Als zweite Stufe beobachtete man eine Wanderung der Eindellung über die Membran, das Blutkörperchen scheint zu rotieren. Dies kann durch die laterale Anisotropie des Zytoskeletts erklärt werden und diejenige elastische Energie, die im Zytoskelett gespeichert wird, wenn es in der Panzerkettenbewegung (die es in der Pantoffelform im Übergang zur Fallschirmform durchläuft) geschert wird [17]. Anschaulich gesprochen zeigt das Blutkörperchen in der zweiten Relaxationsstufe sein Formgedächtnis, welches bewirkt, dass die Eindellung stets von derselben Membranregion gebildet wird [94].

Die elastischen Eigenschaften der Blutkörperchen wurden in den Experimenten auf biochemischen Weg mit ATP (Kapitel 7) und auf chemischem Weg mit Formaldehyd und Diamid (Kapitel 8) verändert. Um diese Änderungen zu erklären, sind molekulare Modelle nötig, die sich über die statistische Thermodynamik mit makroskopischen Phänomenen verknüpfen lassen. Aus molekularer Sicht beruhen die elastischen Eigenschaften der Blutkörperchen vor allem auf seinem hexagonalen Netzwerk (das Zytoskelett), das aus entropischen Federn (Spektrin) geknüpft und über zahlreiche Ankerpunkte mit der Plasmamembran verbunden ist. Für die im Kapillarfluss relevanten Auslenkungen der Spektrinfedern verhält sich das Zytoskelett zudem deutlich nichtlinear [65], [66], [72]. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Relaxationsverhalten und damit die elastischen Eigenschaften der Blutkörperchen von ATP-abhängigen Stoffwechselprozessen reguliert ist, die sich in guter Näherung mit einfachen, thermodynamischen Ratengesetzen beschreiben lassen (Kapitel 7). Für den molekularen Mechanismus ist bekannt, dass insbesondere die Anzahl der Verknüpfungen des Netzwerkes (die Netzwerkdicke) durch ATP reguliert und damit das Schermodul des Zytoskeletts verändert wird [86]. Während die ATP-abhängigen Modifikationen des Zytoskeletts roter Blutkörperchen reversibel sind und letztlich durch Stoffwechselprozesse reguliert werden, sind die durchgeführten chemischen Veränderungen weitestgehend irreversibel.

Sowohl Formaldehyd als auch Diamid sind Modelle für schädliche Umwelteinflüsse (Kapitel 8). Beide verändern auf unterschiedliche Weise die Spektrinmoleküle des Zytoskeletts, die als nichtlineare, entropische Nano-Federn für die Elastizität der Blutkörperchen sorgen. Formaldehyd fällt im Stoffwechsel selbst als giftiges Nebenprodukt an und vernetzt in höheren Konzentrationen Proteine intramolekular. Auch Glukose (Haushaltszucker) kann kovalent an Proteine im Blutkörperchen binden (glykoliertes Hämoglobin dient als Kontrollwert für den Behandlungserfolg von Diabetes mellitus mit Insulin, sog. HbA1c-Wert) und steht im Verdacht, Spektrinmoleküle ähnlich quer zu vernetzen und damit irreparabel zu schädigen [169]. In den Experimenten hat sich gezeigt, dass bei dieser Art der chemischen Modifikation besonders die Formumwandlung von der Pantoffelform in die Fallschirmform beeinträchtigt ist. Sie verläuft im Kapillarfluss daher erst bei höheren Geschwindigkeiten, verglichen mit nativen Zellen. Diamid hingegen reagiert chemisch gesehen ähnlich wie reaktive Sauerstoffspezies und vernetzt die längs umeinander gewundenen Spektrin-Monomere miteinander intermolekular [182]. Anhand einfacher Konzepte der Polymerphysik lässt sich verstehen, wie diese intermolekulare Quervernetzung die entropische Elastizität des Spektrinnetzwerkes verringert und auch die Biegesteifigkeit der Spektrine erhöht.

Im Kapillarfluss durch enge Kapillaren ($D_{cap} < D_{RBC}$) kann das Blutkörperchen diese Art der Versteifung der Membran offensichtlich kompensieren, wenn hohe Scherraten bzw. hohe Reibung vorherrschen. Die Blutkörperchen wandeln sich in engen Kapillaren sogar bei niedrigeren Geschwindigkeiten in die Fallschirmform um als native Zellen. Erklärt werden kann dieses Phänomen durch eine Fluidisierung des Netzwerkes (*Networksoftening*) bei starken Deformationen bzw. hoher, an der Membran angreifender Schubspannung, wenn das Blutkörperchen in Kontakt mit den Kapillarwänden kommt. Networksoftening ist dabei ein Überbegriff für verschiedene molekulare Mechanismen, wie das Auffalten von Spektrindomänen und das Aufbrechen nichtkovalenter Proteinbindungen [67], [68], [72] [69]. Während für formalinbehandelte Blutkörperchen die Zahl der auffaltbaren Domänen verringert und damit der Networksoftening-Mechanismus behindert ist, können in den diamidbehandelten Zellen die Domäne weiterhin entfaltet werden. Damit lassen die hier gezeigten Ergebnisse den Schluss zu, dass dieser molekulare Mechanismus insbesondere für die Umwandlung von Pantoffelform in Fallschirmform eine wichtige Rolle spielt.

Während das dynamische Verhalten roter Blutkörperchen im Kapillarfluss hier eingehend charakterisiert und mit molekularen Modellen erklärt wurde, knüpfen sich an die gewonnenen Erkenntnissen viele neue, spannende Fragen. Das Zytoskelett enthält mit Spektrin eine sehr komplexe und effektive molekulare Nano-Feder, um die Elastizität des Zytoskeletts zu gewährleisten. Als isoliertes Molekül wurden dessen Eigenschaften in AFM-Experimenten bereits häufig untersucht. Um das Zusammenspiel von Spektrin mit den anderen mechanischen Elementen intakter Zellmembranen vollständig zu verstehen, sind neben eher funktionell-physikalisch ausgelegten Experimenten sicher noch aussagekräftige biochemische Analysen nötig, die präzisere Einblicke in die molekulare Regulierung von Zellen erlauben.

Die Formumwandlungen roter Blutkörperchen im Kapillarfluss tritt bei Scherraten auf, bei welchen auch andere wichtige Phänomene auftreten. Hierzu zählen das Auffalten von Spektrin-Domänen, die Abnahme der Bulk-Viskosität suspendierter Blutkörperchen und die Ausschüttung von ATP aus Blutkörperchen. Kann nachgewiesen werden, dass die beschriebene Formumwandlung von Pantoffelform in die Fallschirmform tatsächlich direkt mit einer erhöhten Ausschüttung von ATP verknüpft ist, so könnten die mechanischen Eigenheiten einer wichtigen biochemischen Funktion zugeordnet werden, denn ATP ist an der Regulierung des Blutdruckes beteiligt. Mit der These, dass die Formumwandlung mit einer komplexen Änderung von Proteinkonformationen zusammenhängt, lassen sich neue Ansätze verfolgen, um den molekularen Mechanismus der ATP-Freisetzung genauer aufzuklären. Und schließlich drängt sich hier auch die Frage nach der Rolle der äußersten Zellschicht, der Glykokalix, für das dynamische Verhalten roter Blutkörperchen im Kapillarfluss auf. Denn an ihr greifen die hydrodynamischen Flusskräfte direkt an. Glykophorin, ein kleines aber sehr häufiges integrales Protein der Membranen roter Blutkörperchen, trägt die große Mehrzahl der Kohlenhydrate der nach außen ragenden Glykokalix, einschließlich über 90 % der negativ geladenen Sialinsäuren. Auf seiner Innenseite dockt Glykophorin an den Spektrin-Aktin-Komplex an. Trotz ihrer großen Zahl in roten Blutkörperchen ist die genaue Funktion des Glykophorins unbekannt. Eine Rolle als Mechano-Sensor, der dem Blutkörperchen Wandkontakt

mit Blutgefäßen signalisiert und die Formumwandlung mitsteuert, wäre durchaus denkbar. Der Auflistung spannender Forschungsansätze für die Biophysik, die sich aus dieser Arbeit ergeben, ließen sich noch zahlreiche Fragen hinzufügen.

Mit dieser Arbeit wurde ein wichtiger und detaillierter Überblick geschaffen, um das komplexe Verhalten roter Blutkörperchen im Kapillarfluss zu beschreiben und zu erklären. Grundlegende Zusammenhänge zwischen makroskopischen und nanoskopischen mechanischen Eigenschaften und der molekularen Architektur wurden durch chemische und biochemische Modifikationen der Blutkörperchen aufgezeigt. Damit bildet diese Arbeit wichtige Beiträge und neue Denkansätze für ein besseres Verständnis verschiedener biomechanische Eigenschaften lebender Zellen. Die vorgestellten Modelle können insbesondere auch dazu dienen, theoretische Modelle und Simulationen zu erarbeiten, anhand deren sich experimentell nicht zugängliche Größen betrachten und molekulare Konzepte überprüfen lassen. Aus den hier erprobten, mikrofluidischen Methoden lassen sich weiterhin neue Anwendungen und effektive Designs für miniaturisierte diagnostische Systeme (*Lab-on-a-Chip Systems*) entwickeln.

Anhang

A.1 Probenpräparation

Hier werden die verwendeten Protokolle zur Präparation der Proben beschrieben. Soweit nicht anders angegeben wurden sämtliche hier verwendete Chemikalien von der Firma Sigma Aldrich bezogen.

Allgemeine Aufreinigung der Blutkörperchen

Die roten Blutkörperchen wurden aus Vollblut (versetzt mit EDTA als Gerinnungshemmer) von freiwilligen, gesunden Spendern des Klinikum Augsburg gewonnen. Zur Aufreinigung der Blutkörperchen wird das Vollblut in einem Volumenverhältnis von 1:3 mit gepufferter (pH = 7,4), isotonischer (290 mOsm) Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline, PBS*, bezogen von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gemischt und anschließend bei 3000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand und der weißliche Film aus Leukozyten (*buffy coat*) über den roten Blutkörperchen werden abgenommen und verworfen. Das verbleibende Erythrozytenkonzentrat wird nach demselben Schema noch zwei weitere Male gewaschen. Die aufgereinigten Erythrozyten werden schließlich mit PBS auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt und als Stammsuspension entweder sofort weiter verwendet oder im Kühlschrank bis zur Verwendung aufbewahrt. Sofern im Text nicht anders erwähnt, wurden die Experimente am Tag der Blutentnahme abgeschlossen. Für die Experimente werden die Blutkörperchen in PBS/BSA Puffer (PBS mit 1 gew.-% Rinder Serumalbumin, *bovine serum albumine*) so stark verdünnt, dass die Zellen einzeln durch die Kapillaren fließen (Hämatokrit < 1%).

Chemische Modifikation der Blutkörperchen

Erythrozyten werden mit Formalin (Merck, Darmstadt) chemisch modifiziert, indem 125 µl der Erythrozyten Stammsuspension mit 1000 µl einer Lösung von 0,15 % (6 mM) bzw. 0,30% (12 mM) Formalin in PBS vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Anschließend werden die Blutkörperchen zweimal mit PBS gewaschen und wie die nativen Blutkörperchen weiter verwendet. Für die chemische Modifikation mit Glutarialdehyd (1,5-Pentandial) werden die Blutkörperchen analog in 0,08 % (0,75 mM) bzw. 0,15 % (1,5 mM) Glutarialdehyd für 10 Minuten inkubiert und anschließend gewaschen. Zur Modifikation mit Diamid werden 20 mM bzw. 40 mM Diamid, gelöst in PBS, verwendet, für 15 Minuten inkubiert und anschließend gewaschen. Die diamidbehandelten Blutkörperchen können frühestens 1h nach Inkubation mit Diamid verwendet werden, um die vollständige Ausbildung der Disulfidbrücken sicherzustellen.

Präparation der Blutkörperchen für die Rasterelektronenmikroskopie

Das Blut für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde entweder frisch vom Finger entnommen oder als EDTA-Vollblut vom Klinikum Augsburg zur Verfügung gestellt. Die Blutkörperchen werden gemäß den Schritten der allgemeinen Aufreinigung gewaschen und nach Bedarf chemisch modifiziert. Die vorbereiteten Blutkörperchen werden auf den Probenteller aus Aluminium gegeben und sofort in 1%-igem Glutaraldehyd bei 4°C (45 Minuten bis 2,5 Stunden) fixiert. Anschließend werden die Proben mit PBS gespült und entwässert. Die Entwässerung erfolgt mit einer aufsteigenden Aceton-Reihe. Dabei werden jeweils einmal 30%-ige, 50%-ige, 75%-ige, 96%-ige Aceton-Lösung verwendet und dann zweimal 100%-iges Aceton [214]. Zum Schluss wird die Probe luftgetrocknet und nach Bedarf für den SEM-Modus mit Gold besputtert. Im ESEM-Modus des verwendeten Gerätes (*environmental scanning electron microscopy*) können auch nicht leitfähige Proben untersucht werden, allerdings mit geringerer Auflösung.

Herstellung von Geisterzellen (Erythrozyten-Ghosts)

Um die Proteine der Membran für die Gelelektrophorese aufzureinigen, werden Geisterzellen hergestellt [215]. Dazu werden native und chemisch modifizierte Blutkörperchen (150 µl) in 2 ml Lysis-Puffer (7,5 mM Natriumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,5, H₂O bidest.) für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wird bei 2000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wird wieder mit Lysispuffer überschichtet und resuspendiert. Diese beiden Schritte werden dreimal wiederholt, bis die Blutkörperchenhüllen möglichst frei von Hämoglobin und anderen zytosolischen Bestandteilen sind.

A.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Abbildungen roter Blutkörperchen im Rasterelektronenmikroskop wurden in Zusammenarbeit mit M. Steppich und K. Schneider am Anwenderzentrum für Material und Umweltforschung Augsburg (AMU) an einem Gerät vom Typ ESEM XL 30 FEG der Firma FEI Company erstellt [216] [217]. Für die Abbildung der Erythrozytenpräparate haben sich der BSE-Detektor und eine Beschleunigungsspannung von 25 kV, 20 kV bzw. 25 kV bewährt. Die Aufnahmen wurden typischerweise mit einem Arbeitsabstand (WD) zwischen Probe und Detektor zwischen 4,0 und 4,5 mm erstellt.

A.3 Herstellung der PDMS Mikrokanäle

Die Geometrien für die Mikrokanäle wurden mit der CAD-Software AutoCAD (AutoCAD 2004 Autodesk) entworfen und als Masken in Chrom auf Glas geätzt. Die Masken wurden entweder direkt an der Universität Augsburg am Elektronenstrahlschreiber (RAITH eLine) hergestellt oder

von der Firma ML&C Jena GmbH bezogen. Mit den Chrom-Masken können kleinste Strukturgrößen von 2 µm realisiert werden. Die PDMS-Mikrokanäle werden nach einem softlithographischen Verfahren aus Polydimethylsiloxan (PDMS, Sylgard Elastomer 184 Kit, Dow Corning) angefertigt, das im Folgenden beschrieben ist.

Zur Herstellung der Abgussform für die Kanäle (*Master*) werden Silizium-Wafer (Ausschussware) mittels Schleuderbeschichtung (*Spincoating*) mit dem negativen Photolack SU-8/10 (SU-8 Photoresist, MicroChem) beschichtet. Die Geometrie der Maske wird im Maskaligner (Karl Suss MJB3Mask Aligner, Karl Suss, USA) auf den Photolack übertragen. Die Parameter zur Herstellung des Masters sind in der Tabelle 4 enthalten [218]. Die Kanalhöhe wird bestimmt, indem ein Querschnitt eines PDMS-Mikrokanals mithilfe des Mikroskops vermessen wird.

Tabelle 4: Parameter für die lithographische Herstellung des Masters

Spincoating	30 s @ 500rpm + 30s @ 3000rpm
Softbake	3 min @ 65°C + 7 min @ 95°C
Belichtungszeit	10 s
Post exposure bake	32min @ 65°C + 5 min @ 95°C
Entwicklung	5 - 6 min

A.4 Glaspipettenherstellung und Mikropipetten-Aspirations-Setup

Es werden Borosilikat-Glaskapillaren (Außendurchmesser 1,0 mm, Innendurchmesser 0,58 mm, von WPI, Typ 1B100-4) verwendet, die in einem Pipettenziehgerät auf die gewünschte Länge und den gewünschten Durchmesser gezogen werden (*micropipette puller* P-97, Sutter Instruments) [110]. Hierfür werden folgende Parameter verwendet: Heat 840 (entsprechend Ramp+31), Pull: 30, Velocity: 120, Time 200, Pressure 300. Die Pipetten wurden nach Bedarf an einer Glas-Mikroschmiede (MF-900 Microforge, Narishige) auf den gewünschten Durchmesser gekürzt.

Für die Experimente wird die Glaskapillare an einen Halter montiert, der mit einem höhenverstellbaren Flüssigkeitsreservoir verbunden ist. Über eine Mikrometerschraube lässt sich der hydrostatische Druck präzise einstellen (Abbildung 61). Die Glaspipette selbst befindet sich für die Messung in einer puffergefüllten Probenkammer. Die Mikropipette selbst ist an einem Mikromanipulator (Sutter Instruments MP-285) befestigt, über den sie sich mikrometergenau in x-, y- und z-Richtung in der Probenkammer platzieren lässt.

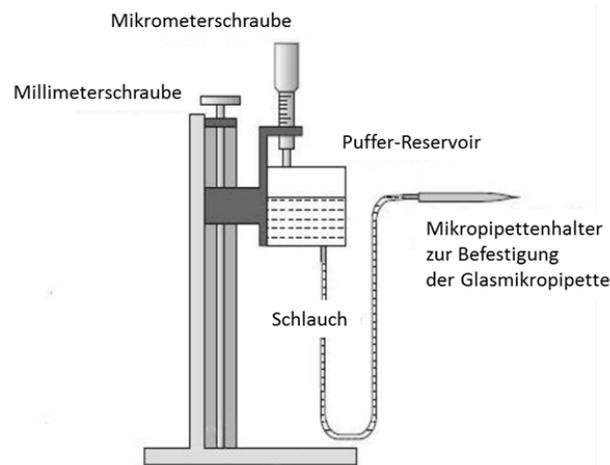


Abbildung 61: schematische Darstellung des Mikropipetten-Aspirations-Setups zur statischen Messung des Schermoduls roter Blutkörperchen. Die Glaspipette ist an ein höhenverstellbares Flüssigkeitsreservoir angeschlossen. Über eine Mikrometerschraube kann der Druck präzise eingestellt werden. Die Mikropipette selbst wird in einer flüssigkeitsgefüllten Probenkammer platziert. Die Abbildung ist entnommen aus [219].

A.5 Vorgehensweise bei der Durchführung der Kapillar-Experimente

Die Glaskapillaren und die PDMS-Kanäle werden vor dem Beginn der Experimente mit PBS-BSA-Puffer mit 10 mg/ml BSA (*Bovine Serum Albumine*, standard grade, Serva Electrophoresis GmbH) für ca. 30 min gespült. Das BSA verhindert, dass die roten Blutkörperchen am Boden des Kanals haften und aufgrund des sogenannten Glaseffekts beim Kontakt mit der Glasoberfläche echinoytisch werden [220]. Zudem erhöht das BSA die Benetzbarkeit der Mikrokanäle und erleichtert somit deren Befüllung. Beim Befüllen des Mikrokanals muss darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen im Kanal oder den Teflonschläuchen eingeschlossen werden, die einen gleichmäßigen Fluss im Kanal behindern.

Der Fluss im Mikrokanal wird über das Auslass-Reservoir geregelt, das höhenverstellbar an einer Gewindestange befestigt ist. Über eine zusätzliche Mikrometerschraube ist eine Feinregulierung möglich. Die PDMS-Mikrokanäle wurden nur einmal pro Messung verwendet, eine Messung ist in der Regel innerhalb weniger Stunden (0,5 - 3h) abgeschlossen. Die chemisch Modifizierten Blutkörperchen wurden synchron mit der nativen Kontrollprobe in einer T-förmigen Kanalgeometrie vermessen, wodurch möglichst identische Bedingungen für beide Proben gewährleistet sind.

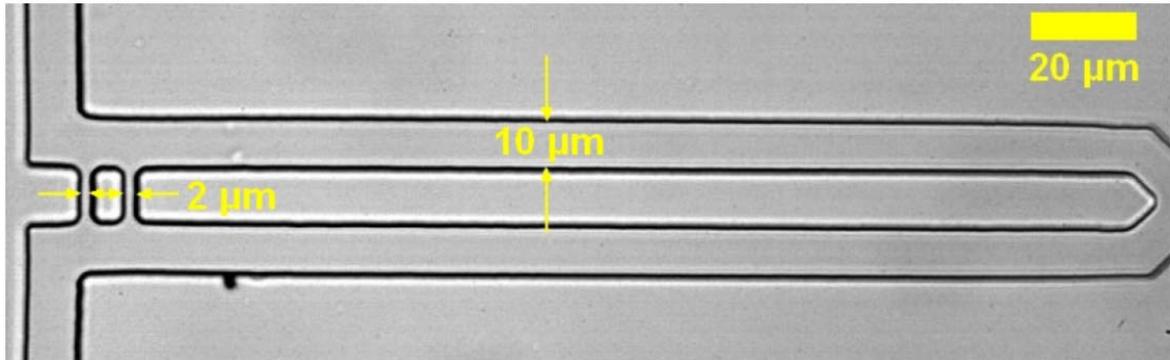


Abbildung 62: T-förmiger PDMS-Mikrokanal mit jeweils einem Einlass links oben und unten im Bild. Zum Auslass hin laufen beide Kanäle zusammen und der hydrostatische Druck wird über ein gemeinsames Flüssigkeitsreservoir am Auslass gesteuert. Zwei schmale, 2 µm breite Verbindungen der getrennten Zuläufe stellen zudem sicher, dass im Messbereich identische Bedingungen herrschen.

Videos zur Datenanalyse wurden mit einer am Mikroskop montierten Hochgeschwindigkeitskamera (Photron Fastcam PCI 1024) oder mit einer CCD Kamera (Hamamatsu C8484-05C, Hamamatsu) aufgenommen. Die Videos wurden entweder bei 40-facher oder 63-facher (Öl-Immersion) Vergrößerung aufgenommen und mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ analysiert. Die Messungen im 10 µm x 10 µm PDMS-Kanal und die Messungen der chemisch modifizierten Blutkörperchen in den Glaskapillaren wurden in Zusammenarbeit mit B. Eggart erstellt [109].

A.6 Gelelektrophorese

In der SDS-Gelelektrophorese werden Proteinen in einem Polyacrylamidgel (Roti[®]-PAGE, Carl Roth, 10% Polyacrylamid) nach in ihrer Größe aufgetrennt. Das Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) entfaltet dabei die Proteine, die sich entlang dem elektrischen Feld, das an dem Gel angelegt wird, auftrennen. Für die Gelelektrophorese wurden sämtliche Chemikalien (Rotiphorese[®] 10x SDS-PAGE Laufpuffer, Gelladepuffer Roti[®]-Load 1 und 2, Proteinmarker Roti[®]-Mark Bicolor) und Geräte wurden von *Carl Roth*[®] bezogen. Die Gelelektrophorese wurde in einer vertikalen Kammer mit fertig gegossenen Minigelen durchgeführt (125 V Gleichstrom je Gel) [221]. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue R250 (gelöst in 50 % Methanol, 10 % Eisessig, 39,7 % Wasser, 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R 250) nach Gebrauchsanweisung gefärbt.

A.7 Umrechnung vom quadratischen auf einen runden Kanalquerschnitt

Will man von einem quadratischen Rohrquerschnitt auf den entsprechenden Radius einer runden Kapillare schließen, lässt sich dieser wie folgt berechnen [222]:

Der Volumenfluss durch einen quadratischen Kanal mit Breite und Höhe $\max(b,h)$ $\min(b,h)$ ist:

$$Q(\text{eckig}) = \frac{K \min(b, h)^3 \max(b, h)}{12\eta l}$$

Mit dem Parameter K:

$$K = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^5} \cdot \frac{192}{\pi^5} \cdot \frac{\min(b, h)}{\max(b, h)} \tanh\left((2n-1) \frac{\pi \max(b, h)}{2 \min(b, h)}\right)$$

Der Volumenfluss in einer runden Kapillare berechnet sich nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille (Gl. 17). Als Zusammenhang zwischen rechteckigen und runden Kanalquerschnitt gilt, nach Gleichsetzen der beiden Volumenflüsse:

$$r^4 = \frac{2 K \min(b, h)^3 \max(b, h)}{3\pi}$$

Speziell für Zusammenhang $10 \times 10 \mu\text{m}$ PDMS- Kanal und Rohrradius gilt $K=0,42174926$ und damit

$$r = \sqrt[4]{\frac{2 \cdot 0,42174926 \cdot 10000 \mu\text{m}^4}{3\pi}} = 5,469 \mu\text{m}$$

Literaturverzeichnis

- [1] T. M. Fischer, M. Stöhr-Lissen, and H. Schmid-Schönbein, "The red cell as a fluid droplet: tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow.," *Science*, vol. 202, no. 4370, pp. 894-6, 1978.
- [2] O. G. Mouritsen and M. J. Zuckermann, "What's so special about cholesterol?," *Lipids*, vol. 39, no. 11, pp. 1101–1113, 2004.
- [3] E. Schrödinger, *Was ist Leben? Die lebende Zelle mit den Augen des Physikers betrachtet*. Piper, 1944.
- [4] E. Sackmann and R. F. Bruinsma, "Cell adhesion as wetting transition?," *European journal of chemical physics and physical chemistry*, vol. 3, no. 3, pp. 262-9, 2002.
- [5] H. J. Deuling and W. Helfrich, "Red blood cell shapes as explained on the basis of curvature elasticity.," *Biophysical journal*, vol. 16, no. 8, pp. 861-8, Aug. 1976.
- [6] E. Sackmann and R. Merkel, *Lehrbuch der Biophysik*. Weinheim: Wiley-VCH-Verl., 2010.
- [7] B. Alberts and L. Jaenicke, *Molekularbiologie der Zelle*, vol. 3. VCH Weinheim, 2004.
- [8] E. Sackmann, "Biological Membranes Architecture and Function," in *Handbook of Biological Physics*, vol. 1, R. Lipowsky and E. Sackmann, Eds. Elsevier, 1995.
- [9] A. J. Baines, "Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks," *Biochemical Society Transactions*, vol. 37, no. 4, p. 796, 2009.
- [10] N. Mohandas and P. G. Gallagher, "Red cell membrane: past, present, and future.," *Blood*, vol. 112, no. 10, pp. 3939-48, Nov. 2008.
- [11] S. Svetina and B. Žekš, "Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red blood cells," *European Biophysics Journal*, vol. 17, no. 2, pp. 101–111, 1989.
- [12] R. Lipowsky, "Vesicles and biomembranes," *Encyclopedia of Applied Physics*, vol. 23, 1998.
- [13] M. Abkarian and A. Viallat, "Vesicles and red blood cells in shear flow," *Soft Matter*, vol. 4, no. 4, p. 653, 2008.

- [14] N. Mohandas and E. Evans, "Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects.," *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, vol. 23, pp. 787-818, Jan. 1994.
- [15] E. Sackmann, "Thermo-elasticity and adhesion as regulators of cell membrane architecture and function," *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 18, no. 45, p. R785-R825, Nov. 2006.
- [16] R. Lipowsky, "The conformation of membranes," *Nature*, vol. 349, no. 6309, pp. 475-481, 1991.
- [17] J. M. Skotheim and T. W. Secomb, "Red Blood Cells and Other Nonspherical Capsules in Shear Flow: Oscillatory Dynamics and the Tank-Treading-to-Tumbling Transition," *Physical Review Letters*, vol. 98, no. 7, pp. 3-6, Feb. 2007.
- [18] I. W. Hamley and V. Castelletto, "Biologische weiche Materialien," *Angewandte Chemie*, vol. 119, no. 24, pp. 4524-4538, Jun. 2007.
- [19] M. L. Ellsworth, C. G. Ellis, D. Goldman, A. H. Stephenson, H. H. Dietrich, and R. S. Sprague, "Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone," *Physiology*, vol. 24, no. 2, p. 107, Apr. 2009.
- [20] N. Barvitenko, N. Adragna, and R. E. Weber, "Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 15, pp. 1-18, 2009.
- [21] A. K. Price, D. J. Fischer, R. S. Martin, and D. M. Spence, "Deformation-induced release of ATP from erythrocytes in a poly(dimethylsiloxane)-based microchip with channels that mimic resistance vessels.," *Analytical chemistry*, vol. 76, no. 16, pp. 4849-55, Aug. 2004.
- [22] J. C. Arciero, B. E. Carlson, and T. W. Secomb, "Theoretical model of metabolic blood flow regulation: roles of ATP release by red blood cells and conducted responses.," *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 295, no. 4, pp. H1562-71, Oct. 2008.
- [23] J. Wan, W. D. Ristenpart, and H. a Stone, "Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 43, pp. 16432-7, Oct. 2008.
- [24] S. Shin, Y. Ku, N. Babu, and M. Singh, "Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus.," *Indian journal of experimental biology*, vol. 45, no. 1, pp. 121-8, Jan. 2007.
- [25] F. R. Maxfield and I. Tabas, "Role of cholesterol and lipid organization in disease.," *Nature*, vol. 438, no. 7068, pp. 612-21, Dec. 2005.

- [26] A. L. Heiner et al., "Effects of cholesterol on physical properties of human erythrocyte membranes: impact on susceptibility to hydrolysis by secretory phospholipase A2.," *Biophysical journal*, vol. 94, no. 8, pp. 3084-93, Apr. 2008.
- [27] X. An and N. Mohandas, "Disorders of red cell membrane.," *British journal of haematology*, vol. 141, no. 3, pp. 367-75, May. 2008.
- [28] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics.," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368-73, Jul. 2006.
- [29] D. L. Polla et al., "Microdevices in medicine.," *Annual review of biomedical engineering*, vol. 2, pp. 551-76, Jan. 2000.
- [30] A. C. Guyton and J. E. Hall, *Textbook of medical physiology*, 10th ed. Saunders, 2000.
- [31] G. Graph von Westphalen, "Lymphkapillaren," <http://pictures.doccheck.com/de/photos/2/7161/sizes/o/> .
- [32] A. S. Popel and P. C. Johnson, "Microcirculation and Hemorrheology," *Annual Review of Fluid Mechanics*, vol. 37, no. 1, pp. 43-69, Jan. 2005.
- [33] A. Bogdanova, M. Berenbrink, and M. Nikinmaa, "Oxygen-dependent ion transport in erythrocytes.," *Acta physiologica*, vol. 195, no. 3, pp. 305-19, Mar. 2009.
- [34] R. E. Wells Jr and E. W. Merrill, "Influence of flow properties of blood upon viscosity-hematocrit relationships," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 41, no. 8, p. 1591, 1962.
- [35] G. R. Cokelet, "Rheology and hemodynamics.," *Annual review of physiology*, vol. 42, pp. 311-24, Jan. 1980.
- [36] R. Skalak, N. Ozkaya, and T. C. Skalak, "Biofluid Mechanics," *Annual Review of Fluid Mechanics*, vol. 21, no. 1, pp. 167-200, Jan. 1989.
- [37] H. Goldsmith, D. Bell, S. Spain, and F. McIntosh, "Effect of red blood cells and their aggregates on platelets and white cells in flowing blood," *Biorheology*, vol. 36, p. 461, 1999.
- [38] G. W. Schmid-Schönbein, "Biomechanics of microcirculatory blood perfusion.," *Annual review of biomedical engineering*, vol. 1, pp. 73-102, Jan. 1999.
- [39] H. H. Lipowsky, "Microvascular rheology and hemodynamics.," *Microcirculation*, vol. 12, no. 1, pp. 5-15, 2005.

- [40] H. Goldsmith and J. Marlow, "Flow behaviour of erythrocytes. I. Rotation and deformation in dilute suspensions," *Proceedings of the Royal Society B*, vol. 182, no. 1068, p. 351, 1972.
- [41] O. K. Baskurt, M. Bor-Küçükataay, and O. Yalçın, "The effect of red blood cell aggregation on blood flow resistance.," *Biorheology*, vol. 36, no. 5-6, pp. 447-52, Jan. 1999.
- [42] S. Kim, A. S. Popel, M. Intaglietta, and P. C. Johnson, "Aggregate formation of erythrocytes in postcapillary venules.," *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 288, no. 2, pp. H584-90, Feb. 2005.
- [43] J. Chen and Z. Huang, "Analytical model for effects of shear rate on rouleau size and blood viscosity.," *Biophysical chemistry*, vol. 58, no. 3, pp. 273-9, Feb. 1996.
- [44] A. Pribush, D. Zilberman-Kravits, and N. Meyerstein, "The mechanism of the dextran-induced red blood cell aggregation.," *European biophysics journal*, vol. 36, no. 2, pp. 85-94, Feb. 2007.
- [45] R. Skalak, P. R. Zarda, K. M. Jan, and S. Chien, "Mechanics of Rouleau formation.," *Biophysical journal*, vol. 35, no. 3, pp. 771-81, Sep. 1981.
- [46] B. Neu, S. O. Sowemimo-Coker, and H. J. Meiselman, "Cell-cell affinity of senescent human erythrocytes.," *Biophysical journal*, vol. 85, no. 1, pp. 75-84, Jul. 2003.
- [47] A. R. Pries, T. W. Secomb, and P. Gaehtgens, "Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature.," *Cardiovascular research*, vol. 32, no. 4, pp. 654-67, Oct. 1996.
- [48] U. Seifert, "Hydrodynamic lift on bound vesicles," *Physical review letters*, vol. 83, no. 4, pp. 876-879, 1999.
- [49] P. Olla, "Simplified model for red cell dynamics in small blood vessels," *Physical review letters*, vol. 82, no. 2, pp. 453-456, 1999.
- [50] Y. Fung and B. Zweifach, "Microcirculation: mechanics of blood flow in capillaries," *Annual Review of Fluid Mechanics*, vol. 3, no. 1, pp. 189-210, 1971.
- [51] H. L. Goldsmith, G. R. Cokelet, and P. Gaehtgens, "Robin Fåhræus: evolution of his concepts in cardiovascular physiology.," *The American journal of physiology*, vol. 257, no. 3 Pt 2, pp. H1005-15, Sep. 1989.
- [52] J. S. Gibson, a R. Cossins, and J. C. Ellory, "Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells.," *The Journal of experimental biology*, vol. 203, no. 9, pp. 1395-407, May. 2000.

- [53] C. Geers and G. Gros, "Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle.," *Physiological reviews*, vol. 80, no. 2, pp. 681-715, Apr. 2000.
- [54] S. Chien, "Red cell deformability and its relevance to blood flow.," *Annual review of physiology*, vol. 49, pp. 177-92, Jan. 1987.
- [55] H. Ringsdorf, B. Schlarb, and J. Venzmer, "Molekulare Architektur und Funktion von polymeren orientierten Systemen—Modelle für das Studium von Organisation, Oberflächenerkennung und Dynamik bei Biomembranen," *Angewandte Chemie*, vol. 100, no. 1, pp. 117–162, 1988.
- [56] M. Edidin, "Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 4, no. 5, pp. 414-8, May. 2003.
- [57] K. Simons, "How Cells Handle Cholesterol," *Science*, vol. 290, no. 5497, pp. 1721-1726, Dec. 2000.
- [58] S. C. Liu, L. H. Derick, and J. Palek, "Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton.," *The Journal of cell biology*, vol. 104, no. 3, p. 527, 1987.
- [59] T. J. Byers and D. Branton, "Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 18, pp. 6153-7, Sep. 1985.
- [60] D. H. Boal, *Mechanics of the Cell*. Cambridge Univ Pr, 2002.
- [61] E. A. Evans, "Structure and deformation properties of red blood cells: Concepts and quantitative methods," *Methods in enzymology*, vol. 173, pp. 3–35, 1989.
- [62] G. Lenormand, S. Hénon, a Richert, J. Siméon, and F. Gallet, "Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton.," *Biophysical journal*, vol. 81, no. 1, pp. 43-56, Jul. 2001.
- [63] R. M. Hochmuth and R. E. Waugh, "Erythrocyte membrane elasticity and viscosity.," *Annual review of physiology*, vol. 49, pp. 209-19, Jan. 1987.
- [64] B. T. Stokke, A. Mikkelsen, and A. Elgsaeter, "Spectrin, human erythrocyte shapes, and mechanochemical properties," *Biophysical journal*, vol. 49, no. 1, pp. 319–327, Jan. 1986.
- [65] S. K. Boey, D. H. Boal, and D. E. Discher, "Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. I. Microscopic models.," *Biophysical journal*, vol. 75, no. 3, pp. 1573-83, Sep. 1998.

- [66] D. E. Discher, D. H. Boal, and S. K. Boey, "Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. II. Micropipette aspiration.," *Biophysical journal*, vol. 75, no. 3, pp. 1584-97, Sep. 1998.
- [67] C. P. Johnson, H.-Y. Tang, C. Carag, D. W. Speicher, and D. E. Discher, "Forced unfolding of proteins within cells.," *Science*, vol. 317, no. 5838, pp. 663-6, Aug. 2007.
- [68] X. An, M. C. Lecomte, J. A. Chasis, N. Mohandas, and W. Gratzer, "Shear-response of the spectrin dimer-tetramer equilibrium in the red blood cell membrane," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 35, p. 31796, 2002.
- [69] D. E. Discher, N. Mohandas, and E. a Evans, "Molecular maps of red cell deformation: hidden elasticity and in situ connectivity.," *Science*, vol. 266, no. 5187, pp. 1032-5, Nov. 1994.
- [70] V. Ortiz, S. O. Nielsen, M. L. Klein, and D. E. Discher, "Unfolding a linker between helical repeats.," *Journal of molecular biology*, vol. 349, no. 3, pp. 638-47, Jun. 2005.
- [71] J. C. Lee and D. E. Discher, "Deformation-enhanced fluctuations in the red cell skeleton with theoretical relations to elasticity, connectivity, and spectrin unfolding.," *Biophysical journal*, vol. 81, no. 6, pp. 3178-92, Dec. 2001.
- [72] J. Li, G. Lykotrafitis, M. Dao, and S. Suresh, "Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 12, pp. 4937-42, Mar. 2007.
- [73] P. Boivin, "Role of the phosphorylation of red blood cell membrane proteins.," *The Biochemical journal*, vol. 256, no. 3, pp. 689-95, Dec. 1988.
- [74] S. Manno, Y. Takakuwa, and K. Nagao, "Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by-spectrin phosphorylation and dephosphorylation," *Journal of Biological*, vol. 270, no. 10, pp. 5659-5665, 1995.
- [75] T. Betz, M. Lenz, J.-F. Joanny, and C. Sykes, "ATP-dependent mechanics of red blood cells.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 36, pp. 15320-5, Sep. 2009.
- [76] D. Lerche, M. M. Kozlov, and W. Meier, "Time-dependent elastic extensional RBC deformation by micropipette aspiration: redistribution of the spectrin network?," *European Biophysics Journal*, vol. 19, no. 6, pp. 301-309, May. 1991.
- [77] B. T. Stokke, A. Mikkelsen, and A. J. O. T. El, "The Human Erythrocyte Membrane Skeleton May Be An Ionic Gel . III . Micropipette Aspiration of Unswollen Erythrocytes," *J. theor. Biol.*, vol. 123, pp. 205-211, 1986.

- [78] B. T. Stokke, A. Mikkelsen, and A. Elgsaeter, "The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel. I. Membrane mechanochemical properties," *Journal of theoretical biology*, vol. 13, no. 2, pp. 205-11, Nov. 1986.
- [79] L. D. Landau, E. M. Lifschitz, and P. Ziesche, *Lehrbuch der theoretischen Physik: Elastizitätstheorie*, 3rd ed., vol. 1. Harri Deutsch Verlag, 1997.
- [80] W. Helfrich, "Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments," *Z. Naturforsch*, vol. 28, no. 11, pp. 693–703, 1973.
- [81] H. Dumez, W. H. Reinhart, G. Guetens, and E. a de Bruijn, "Human red blood cells: rheological aspects, uptake, and release of cytotoxic drugs.," *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, vol. 41, no. 2, pp. 159-88, Jan. 2004.
- [82] S. Svetina, D. Kuzman, R. E. Waugh, P. Ziherl, and B. Zeks, "The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells.," *Bioelectrochemistry*, vol. 62, no. 2, pp. 107-13, May. 2004.
- [83] T. M. Fischer, C. W. Haest, M. Stöhr-Liesen, H. Schmid-Schönbein, and R. Skalak, "The stress-free shape of the red blood cell membrane.," *Biophysical journal*, vol. 34, no. 3, pp. 409-22, Jun. 1981.
- [84] G. Lim H W, M. Wortis, and R. Mukhopadhyay, "Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer- couple hypothesis from membrane mechanics.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 26, pp. 16766-9, Dec. 2002.
- [85] S. Svetina and B. Zeks, "Membrane active compounds that affect the shape of cells and cellular organelles," *Cellular and Molecular Biology Letters*, vol. 6, no. 2, pp. 305–312, 2001.
- [86] N. S. Gov and S. a Safran, "Red blood cell membrane fluctuations and shape controlled by ATP-induced cytoskeletal defects.," *Biophysical journal*, vol. 88, no. 3, pp. 1859-74, Mar. 2005.
- [87] U. Seifert, "Configurations of fluid membranes and vesicles," *Advances in Physics*, vol. 46, no. 1, pp. 13-137, Feb. 1997.
- [88] U. Seifert, K. Berndl, and R. Lipowsky, "Shape transformations of vesicles: Phase diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models," *Physical Review A*, vol. 44, no. 2, p. 1182, 1991.
- [89] R. Mukhopadhyay, G. Lim H W, and M. Wortis, "Echinocyte shapes: bending, stretching, and shear determine spicule shape and spacing.," *Biophysical Journal*, vol. 82, no. 4, pp. 1756-1772, Apr. 2002.

- [90] H. Noguchi and G. Gompper, "Shape transitions of fluid vesicles and red blood cells in capillary flows.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 40, pp. 14159-64, Oct. 2005.
- [91] H. Noguchi, "Dynamic modes of microcapsules in steady shear flow: Effects of bending and shear elasticities," *Physical Review E*, vol. 81, no. 5, p. 056319, 2010.
- [92] S. Braunmüller, L. Schmid, and T. Franke, "Dynamics of red blood cells and vesicles in microchannels of oscillating width," *Journal of Physics:*, vol. 23, no. 18, p. 184116, 2011.
- [93] M. Abkarian, M. Faivre, and A. Viallat, "Swinging of Red Blood Cells under Shear Flow," *Physical Review Letters*, vol. 98, no. 18, pp. 2-5, Apr. 2007.
- [94] T. M. Fischer, "Shape memory of human red blood cells.," *Biophysical journal*, vol. 86, no. 5, pp. 3304-13, May. 2004.
- [95] A. Lendlein and S. Kelch, "Formgedächtniseffekt," *Angewandte Chemie*, vol. 114, p. 2138, 2002.
- [96] G. Danker and C. Misbah, "Rheology of a Dilute Suspension of Vesicles," *Physical Review Letters*, vol. 98, no. 8, pp. 3-6, Feb. 2007.
- [97] R. Finken, S. Kessler, and U. Seifert, "Micro-capsules in shear flow.," *Journal of physics: Condensed matter*, vol. 23, no. 18, p. 184113, May. 2011.
- [98] M. Abkarian, M. Faivre, R. Horton, K. Smistrup, C. A. Best-Popescu, and H. A. Stone, "Cellular-scale hydrodynamics.," *Biomedical materials*, vol. 3, no. 3, p. 034011, Sep. 2008.
- [99] B. Kaoui, G. Biroso, and C. Misbah, "Why Do Red Blood Cells Have Asymmetric Shapes Even in a Symmetric Flow?," *Physical Review Letters*, vol. 103, no. 18, pp. 1-4, Oct. 2009.
- [100] H. Stone, A. Forsyth, and J. Wan, "Slipping through blood flow," *Physics*, vol. 2, Oct. 2009.
- [101] T. Franke and A. Wixforth, "Microfluidics for miniaturized laboratories on a chip.," *European journal of chemical physics and physical chemistry*, vol. 9, no. 15, pp. 2140-56, Oct. 2008.
- [102] P. Tabeling, *Introduction to microfluidics*. Oxford New York: Oxford University Press, 2005.

- [103] D. J. Beebe, G. a Mensing, and G. M. Walker, "Physics and applications of microfluidics in biology.," *Annual review of biomedical engineering*, vol. 4, pp. 261-86, Jan. 2002.
- [104] Y. Xia and G. M. Whitesides, "Soft lithography," *Angewandte Chemie (International ed.)*, vol. 37, p. 550, 1998.
- [105] H. Wu, T. W. Odom, D. T. Chiu, and G. M. Whitesides, "Fabrication of complex three-dimensional microchannel systems in PDMS.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, no. 2, pp. 554-9, Jan. 2003.
- [106] D. Meschede, *Gerthsen Physik*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2004.
- [107] L. D. Landau and E. M. Lifschitz, *Lehrbuch der theoretischen Physik: Hydrodynamik*, 3rd ed. Harri Deutsch Verlag, 1997.
- [108] E. M. Purcell, "Life at low Reynolds number," *American Journal of Physics*, vol. 45, no. 3, p. 11, 1977.
- [109] B. Eggart, "Chemically Modified Red Blood Cells in Fluidic Environment," Universität Augsburg, Master Thesis, 2010.
- [110] "Sutter Instruments Pipette Cookbook," www.sutter.com. .
- [111] "<http://www.mikroskopie.de/kurse/phasenstrahl.htm>." .
- [112] W. S. Rasband, "ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda Maryland, USA," <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011. .
- [113] D. M. Czajkowsky, H. Iwamoto, and Z. Shao, "Atomic force microscopy in structural biology: from the subcellular to the submolecular.," *Journal of electron microscopy*, vol. 49, no. 3, pp. 395-406, Jan. 2000.
- [114] a M. McGough and R. Josephs, "On the structure of erythrocyte spectrin in partially expanded membrane skeletons.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 13, pp. 5208-12, Jul. 1990.
- [115] P. J. Goodhew, U. Clewing, and F. Humphreys, *Elektronenmikroskopie: Grundlagen und Anwendung*. Maidenhead: McGraw-Hill, 1994.
- [116] T. M. Fischer, "Cross bonding and stiffening of the red cell membrane.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 985, no. 2, pp. 218-28, Oct. 1989.
- [117] K. Zeman, H. Engelhard, and E. Sackmann, "Bending undulations and elasticity of the erythrocyte membrane: effects of cell shape and membrane organization.," *European biophysics journal*, vol. 18, no. 4, pp. 203-19, Jan. 1990.

- [118] T. Auth, S. Safran, and N. Gov, "Fluctuations of coupled fluid and solid membranes with application to red blood cells," *Physical Review E*, vol. 76, no. 5, Nov. 2007.
- [119] N. Gov, "Active elastic network: Cytoskeleton of the red blood cell," *Physical Review E*, vol. 75, no. 1, pp. 1-6, Jan. 2007.
- [120] Y. Park et al., "Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 15, pp. 6731-6, May. 2010.
- [121] M. Girasole et al., "The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness.," *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, vol. 6, no. 6, pp. 760-8, Dec. 2010.
- [122] U. J. Dumaswala, R. U. Dumaswala, D. S. Levin, and T. J. Greenwalt, "Improved red blood cell preservation correlates with decreased loss of bands 3, 4.1, acetylcholinesterase, and lipids in microvesicles.," *Blood*, vol. 87, no. 4, pp. 1612-6, Feb. 1996.
- [123] J. Neumann, M. Hennig, A. Wixforth, S. Manus, J. O. Rädler, and M. F. Schneider, "Transport, separation, and accumulation of proteins on supported lipid bilayers.," *Nano letters*, vol. 10, no. 8, pp. 2903-8, Aug. 2010.
- [124] D. W. Knowles, L. Tilley, N. Mohandas, and J. a Chasis, "Erythrocyte membrane vesiculation: model for the molecular mechanism of protein sorting.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 24, pp. 12969-74, Nov. 1997.
- [125] T. A. Kalfa et al., "Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton," *Blood*, vol. 108, no. 12, p. 3637, 2006.
- [126] D. K. Smith and J. Palek, "Modulation of lateral mobility of band 3 in the red cell membrane by oxidative cross-linking of spectrin," *Nature*, vol. 297, p. 424, 1982.
- [127] S. Lows, "Kinetics and Regulation of the Ankyrin-Band Human Red Blood Cell Membrane * 3 Interaction," *Biochemistry*, vol. 265, no. 27, pp. 16166-16172, 1990.
- [128] P. S. Low, B. M. Willardson, N. Mohandas, M. Rossi, and S. Shohet, "Contribution of the band 3-ankyrin interaction to erythrocyte membrane mechanical stability.," *Blood*, vol. 77, no. 7, pp. 1581-6, Apr. 1991.
- [129] P. S. Becker, C. M. Cohen, and S. E. Lux, "The effect of mild diamide oxidation on the structure and function of human erythrocyte spectrin.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 261, no. 10, pp. 4620-8, Apr. 1986.

- [130] J. K. Armstrong, R. B. Wenby, H. J. Meiselman, and T. C. Fisher, "The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation.," *Biophysical journal*, vol. 87, no. 6, pp. 4259-70, Dec. 2004.
- [131] G. Danker, P. M. Vlahovska, and C. Misbah, "Vesicles in Poiseuille flow," *Physical review letters*, vol. 102, no. 14, p. 148102, 2009.
- [132] R. Skalak and P. Branemark, "Deformation of red blood cells in capillaries," *Science*, vol. 164, no. 3880, p. 717, 1969.
- [133] R. M. Hochmuth, R. N. Marple, and S. P. Suter, "Capillary blood flow," *Microvascular Research*, no. 1, p. 409, Jan. 1970.
- [134] P. Gaetgens and H. Schmid-Schönbein, "Mechanisms of dynamic flow adaptation of mammalian erythrocytes," *Naturwissenschaften*, vol. 69, no. 6, pp. 294–296, 1982.
- [135] T. W. Secomb, "Flow-Dependent Rheological Properties of Blood in Capillaries," *Microvascular Research*, vol. 34, p. 46, 1987.
- [136] D. Braasch, "Red cell deformability and capillary blood flow," *Physiological Reviews*, vol. 51, no. 4, p. 679, 1971.
- [137] A. M. Forsyth, J. Wan, P. D. Owrutsky, M. Abkarian, and H. A. Stone, "Multiscale approach to link red blood cell dynamics, shear viscosity, and ATP release," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 27, p. 10986, 2011.
- [138] H. Noguchi, G. Gompper, L. Schmid, a Wixforth, and T. Franke, "Dynamics of fluid vesicles in flow through structured microchannels," *EPL (Europhysics Letters)*, vol. 89, no. 2, p. 28002, Jan. 2010.
- [139] P. Olla, "The lift on a tank-treading ellipsoidal cell in a shear flow," *Journal de Physique II*, vol. 7, p. 1533, 1997.
- [140] M. Abkarian, C. Lartigue, and A. Viallat, "Tank treading and unbinding of deformable vesicles in shear flow: Determination of the lift force," *Physical review letters*, vol. 88, no. 6, p. 68103, Jan. 2002.
- [141] S. Braunmüller, "Viskoelastische Deformation roter Blutkörperchen," LMU München, Master Thesis, 2007.
- [142] G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, vol. 4. Wiley-VCH Weinheim, 1997.

- [143] Q. Zhu, C. Vera, R. J. Asaro, P. Sche, and L. A. Sung, "A hybrid model for erythrocyte membrane: a single unit of protein network coupled with lipid bilayer.," *Biophysical journal*, vol. 93, no. 2, pp. 386-400, Jul. 2007.
- [144] Q. Zhu and R. J. Asaro, "Spectrin folding versus unfolding reactions and RBC membrane stiffness.," *Biophysical journal*, vol. 94, no. 7, pp. 2529-45, Apr. 2008.
- [145] M. R. Kaazempur Mofrad, N. a Abdul-Rahim, H. Karcher, P. J. Mack, B. Yap, and R. D. Kamm, "Exploring the molecular basis for mechanosensation, signal transduction, and cytoskeletal remodeling.," *Acta biomaterialia*, vol. 1, no. 3, pp. 281-93, May. 2005.
- [146] A. F. Oberhauser and M. Carrión-Vázquez, "Mechanical biochemistry of proteins one molecule at a time.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 11, pp. 6617-21, Mar. 2008.
- [147] C. Pozrikidis, "Numerical Simulation of the Flow-Induced Deformation of Red Blood Cells," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 31, no. 10, pp. 1194-1205, Nov. 2003.
- [148] M. Costa, I. Ghiran, C.-K. Peng, A. Nicholson-Weller, and A. Goldberger, "Complex dynamics of human red blood cell flickering: Alterations with in vivo aging," *Physical Review E*, vol. 78, no. 2, pp. 1-4, Aug. 2008.
- [149] H. Abe, M. Orita, and S. Arichi, "Erythrocyte deformability in aging," *Mechanisms of ageing and development*, vol. 27, no. 3, pp. 383-390, 1984.
- [150] P. Zihlerl and S. Svetina, "Nonaxisymmetric phospholipid vesicles: Rackets, boomerangs, and starfish," *Europhysics Letters*, vol. 70, no. 5, pp. 690-696, Jun. 2005.
- [151] M. Rief, J. Pascual, M. Saraste, and H. E. Gaub, "Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: low unfolding forces in helix bundles.," *Journal of molecular biology*, vol. 286, no. 2, pp. 553-61, Feb. 1999.
- [152] T. Secomb, R. Hsu, and A. Pries, "A model for red blood cell motion in glycocalyx-lined capillaries," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 274, no. 3, p. H1016, 1998.
- [153] A. R. Pries, T. W. Secomb, H. Jacobs, M. Sperandio, K. Osterloh, and P. Gaehtgens, "Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer.," *The American journal of physiology*, vol. 273, no. 5 Pt 2, pp. H2272-9, Nov. 1997.
- [154] J. H. Jeong, Y. Sugii, M. Minamiyama, and K. Okamoto, "Measurement of RBC deformation and velocity in capillaries in vivo.," *Microvascular research*, vol. 71, no. 3, pp. 212-7, May. 2006.

- [155] C. H. Wang and a S. Popel, "Effect of red blood cell shape on oxygen transport in capillaries.," *Mathematical biosciences*, vol. 116, no. 1, pp. 89-110, Jul. 1993.
- [156] H. Engelhardt, H. Gaub, and E. Sackmann, "Viscoelastic properties of erythrocyte membranes in high-frequency electric fields," *Nature*, vol. 307, pp. 378 - 380, 1984.
- [157] J. P. Shelby, J. White, K. Ganesan, P. K. Rathod, and D. T. Chiu, "A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 25, pp. 14618-22, Dec. 2003.
- [158] R. Cooper, "Anemia with spur cells: a red cell defect acquired in serum and modified in the circulation.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 48, no. 10, pp. 1820-31, Oct. 1969.
- [159] T. Franke and A. Wixforth, "Das Labor auf dem Chip: Mikrofluidik," *Physik in unserer Zeit*, vol. 38, no. 2, pp. 88-94, Mar. 2007.
- [160] T. Squires and S. Quake, "Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale," *Reviews of Modern Physics*, vol. 77, no. 3, pp. 977-1026, Oct. 2005.
- [161] J. Sleep, D. Wilson, R. Simmons, and W. Gratzer, "Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study.," *Biophysical journal*, vol. 77, no. 6, pp. 3085-95, Dec. 1999.
- [162] P. J. Bronkhorst, G. J. Streekstra, J. Grimbergen, E. J. Nijhof, J. J. Sixma, and G. J. Brakenhoff, "A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping.," *Biophysical journal*, vol. 69, no. 5, pp. 1666-73, Nov. 1995.
- [163] J. Hansen, R. Skalak, and S. Chien, "An elastic network model based on the structure of the red blood cell membrane skeleton," *Biophysical journal*, vol. 70, no. January, pp. 146-166, 1996.
- [164] J. Palek, G. Stewart, and F. J. Lionetti, "The dependence of shape of human erythrocyte ghosts on calcium, magnesium, and adenosine triphosphate.," *Blood*, vol. 44, no. 4, pp. 583-97, Oct. 1974.
- [165] M. Nakao, T. Nakao, S. Yamazoe, and H. Yoshikawa, "Adenosine Triphosphate and Shape of Erythrocytes," *The Journal of biochemistry*, vol. 49, no. 6, p. 487, 1961.
- [166] C. Feo and N. Mohandas, "Clarification of role of ATP in red-cell morphology and function," *Nature*, vol. 265, pp. 166-167, 1977.

- [167] H. K. Jindal, Z. Ai, P. Gascard, C. Horton, and C. M. Cohen, "Specific loss of protein kinase activities in senescent erythrocytes.," *Blood*, vol. 88, no. 4, pp. 1479-87, Aug. 1996.
- [168] X. L. An, Y. Takakuwa, W. Nunomura, S. Manno, and N. Mohandas, "Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1. Functional implications in regulation of erythrocyte membrane mechanical properties.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 52, pp. 33187-91, Dec. 1996.
- [169] S. Manno, N. Mohandas, and Y. Takakuwa, "ATP-dependent mechanism protects spectrin against glycation in human erythrocytes.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 44, pp. 33923-9, Oct. 2010.
- [170] C. J. Féo and P. F. Leblond, "The discocyte-echinocyte transformation: comparison of normal and ATP-enriched human erythrocytes.," *Blood*, vol. 44, no. 5, pp. 639-47, Nov. 1974.
- [171] S. R. Keller and R. Skalak, "Motion of a tank-treading ellipsoidal particle in a shear flow," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 120, no. 1, pp. 27-47, 1982.
- [172] D. E. Golan and W. Veatch, "Lateral mobility of band 3 in the human erythrocyte membrane studied by fluorescence photobleaching recovery: evidence for control by cytoskeletal interactions," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 77, no. 5, p. 2537, 1980.
- [173] P. A. A. Marks, A. B. Johnson, and E. Hirschberg, "Effect of age on the enzyme activity in erythrocytes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 44, no. 6, p. 529, 1958.
- [174] J. C. Lee, D. T. Wong, and D. E. Discher, "Direct measures of large, anisotropic strains in deformation of the erythrocyte cytoskeleton.," *Biophysical journal*, vol. 77, no. 2, pp. 853-64, Aug. 1999.
- [175] K. Mubagwa, K. Mullane, and W. Flameng, "Role of adenosine in the heart and circulation.," *Cardiovascular research*, vol. 32, no. 5, pp. 797-813, Nov. 1996.
- [176] O. P. Hamill and B. Martinac, "Molecular basis of mechanotransduction in living cells.," *Physiological reviews*, vol. 81, no. 2, pp. 685-740, Apr. 2001.
- [177] C. S. Chen, "Mechanotransduction - a field pulling together?," *Journal of cell science*, vol. 121, no. 20, pp. 3285-92, Oct. 2008.
- [178] C. Zhu, G. Bao, and N. Wang, "Cell mechanics: mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 2, no. 1, pp. 189-226, 2000.

- [179] A. M. Forsyth, J. Wan, W. D. Ristenpart, and H. a Stone, "The dynamic behavior of chemically 'stiffened' red blood cells in microchannel flows.," *Microvascular research*, vol. 80, no. 1, pp. 37-43, Jul. 2010.
- [180] G. J. Johnson, D. W. Allen, T. P. Flynn, B. Finkel, and J. G. White, "Decreased survival in vivo of diamide-incubated dog erythrocytes. A model of oxidant-induced hemolysis.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 66, no. 5, pp. 955-61, Nov. 1980.
- [181] N. S. Kosower, E. M. Kosower, B. Wertheim, and W. S. Correa, "Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 37, no. 4, pp. 593-596, 1969.
- [182] C. W. Haest, D. Kamp, G. Plasa, and B. Deuticke, "Intra- and intermolecular cross-linking of membrane proteins in intact erythrocytes and ghosts by SH-oxidizing agents.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 469, no. 2, pp. 226-30, Sep. 1977.
- [183] G. Driessen et al., "Capillary resistance to flow of hardened (diamide treated) red blood cells (RBC)," *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 392, no. 3, pp. 261-267, 1982.
- [184] P. A. M. M. Aarts, R. M. R. Heethaar, and J. J. Sixma, "Red blood cell deformability influences platelets-vessel wall interaction in flowing blood," *Blood*, vol. 64, no. 6, p. 1228, 1984.
- [185] K. S. Lang et al., "Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes.," *Cell death and differentiation*, vol. 10, no. 2, pp. 249-56, Feb. 2003.
- [186] R. S. Richards, L. Wang, and H. Jelinek, "Erythrocyte oxidative damage in chronic fatigue syndrome.," *Archives of medical research*, vol. 38, no. 1, pp. 94-8, Jan. 2007.
- [187] S. Yedgar, A. Koshkaryev, and G. Barshtein, "The red blood cell in vascular occlusion.," *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, vol. 32, no. 5-6, pp. 263-8, 2002.
- [188] R. Messmann, S. Gannon, S. Sarnaik, and R. M. Johnson, "Mechanical properties of sickle cell membranes.," *Blood*, vol. 75, no. 8, pp. 1711-7, Apr. 1990.
- [189] S. K. Jain, "Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 264, no. 35, pp. 21340-5, Dec. 1989.
- [190] G. Eisenbrand and M. Metzler, *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*. Stuttgart, New York: Thieme, 2001.

- [191] J. R. Cooper and M. M. Kini, "The biochemistry of methanol poisoning.," *Biochemical pharmacology*, vol. 9, no. 1956, pp. 145-8, Aug. 1962.
- [192] H. Beyer, W. Francke, and W. Walter, *Lehrbuch der Organischen Chemie*. Stuttgart: Hirzel, 2004.
- [193] J. Mason and T. O'Leary, "Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation.," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 39, no. 2, p. 225, 1991.
- [194] National Institutes of Health (NIH), "<http://de.wikibooks.org/wiki/Datei:AlphaHelixProtein.jpg>."
- [195] L. M. Snyder et al., "The role of membrane protein sulfhydryl groups in hydrogen peroxide-mediated membrane damage in human erythrocytes," *et Biophysica Acta (BBA)*, vol. 937, pp. 229-240, 1988.
- [196] T. Berg, J. Tymoczko, and L. Stryer, "Stryer: Biochemie." Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
- [197] C. W. Haest, D. Kamp, and B. Deuticke, "Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 643, no. 2, pp. 319-26, May. 1981.
- [198] J. a Chasis and S. L. Schrier, "Membrane deformability and the capacity for shape change in the erythrocyte.," *Blood*, vol. 74, no. 7, pp. 2562-8, Nov. 1989.
- [199] C. Haest, D. Kamp, and B. Deuticke, "Formation of disulfide bonds between glutathione and membrane SH groups in human erythrocytes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 557, no. 2, pp. 363-371, 1979.
- [200] A. Chakrabarti, D. a Kelkar, and A. Chattopadhyay, "Spectrin organization and dynamics: new insights.," *Bioscience reports*, vol. 26, no. 6, pp. 369-86, Dec. 2006.
- [201] J. a Chasis and N. Mohandas, "Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations.," *The Journal of cell biology*, vol. 103, no. 2, pp. 343-50, Aug. 1986.
- [202] W. Meier, "Die statische und dynamische Deformierbarkeit der menschlichen roten Blutzelle," Humboldt-Universität Berlin, 1988.
- [203] H. Engelhardt and E. Sackmann, "On the measurement of shear elastic moduli and viscosities of erythrocyte plasma membranes by transient deformation in high frequency electric fields," *Biophysical journal*, vol. 54, no. 3, pp. 495-508, Sep. 1988.

- [204] T. W. Secomb and R. Hsu, "Analysis of red blood cell motion through cylindrical micropores: effects of cell properties.," *Biophysical journal*, vol. 71, no. 2, pp. 1095-101, Aug. 1996.
- [205] R. M. Hochmuth, "Micropipette aspiration of living cells.," *Journal of biomechanics*, vol. 33, no. 1, pp. 15-22, Jan. 2000.
- [206] G. Lee, K. Abdi, Y. Jiang, P. Michaely, V. Bennett, and P. E. Marszalek, "Nanospring behaviour of ankyrin repeats.," *Nature*, vol. 440, no. 7081, pp. 246-9, Mar. 2006.
- [207] J. a Tolomeo, C. R. Steele, and M. C. Holley, "Mechanical properties of the lateral cortex of mammalian auditory outer hair cells.," *Biophysical journal*, vol. 71, no. 1, pp. 421-9, Jul. 1996.
- [208] P. Mangeol, D. Côte, T. Bizebard, O. Legrand, and U. Bockelmann, "Probing DNA and RNA single molecules with a double optical tweezer.," *The European physical journal. E, Soft matter*, vol. 19, no. 3, pp. 311-7, Mar. 2006.
- [209] E. a Evans, "Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipet aspiration tests.," *Biophysical journal*, vol. 43, no. 1, pp. 27-30, Jul. 1983.
- [210] Y. Kikuchi, Q. W. Da, and T. Fujino, "Variation in red blood cell deformability and possible consequences for oxygen transport to tissue," *Microvascular research*, vol. 47, no. 2, pp. 222-231, 1994.
- [211] T. W. Secomb, R. Hsu, and A. R. Pries, "Motion of red blood cells in a capillary with an endothelial surface layer: effect of flow velocity.," *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 281, no. 2, pp. H629-36, Aug. 2001.
- [212] A. R. Pries and T. W. Secomb, "Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer.," *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 289, no. 6, pp. H2657-64, Dec. 2005.
- [213] X. Trepate et al., "Universal physical responses to stretch in the living cell.," *Nature*, vol. 447, no. 7144, pp. 592-5, May. 2007.
- [214] K. A. Rosenbauer and B. H. Kegel, *Rasterelektronenmikroskopische Technik. Präparationsverfahren in Medizin und Biologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1978.
- [215] V. Bennett, "Proteins involved in membrane--cytoskeleton association in human erythrocytes: Spectrin, ankyrin, and band 3," *Methods in Enzymology*, 1983.

- [216] K. Schneider, "Erythrozyten - Abbildungen mit dem Rasterkraftmikroskop und dem Rasterelektronenmikroskop," Universität Augsburg, Schriftliche Hausarbeit zur 1. Staatsprüfung, 2010.
- [217] M. Steppich, "Aufnahmen von Erythrozyten und deren Sonderformen mit dem Rasterelektronenmikroskop und dem Rasterkraftmikroskop," Universität Augsburg, Schriftliche Hausarbeit zur 1. Staatsprüfung, 2010.
- [218] MicroChem, *SU-8 Negative Tone Photoresist - Datasheet*. .
- [219] T. M. Neumaier, "Mechanical Forces during Cell Adhesion – Physical Perspectives of Metastasis," Universität Augsburg, Diplomarbeit, 2006.
- [220] L. E. Eriksson, "On the shape of human red blood cells interacting with flat artificial surfaces--the 'glass effect' .," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1036, no. 3, pp. 193-201, Dec. 1990.
- [221] "Instruction Manual Roti -PAGE Precast Gels," *Pharmacia*. .
- [222] H. Bruus, *Theoretical microfluidics*, vol. 18. Oxford University Press, USA, 2008.

Danksagung

Beginnen können ist Stärke, vollenden können ist Kraft (unbekannter Autor)

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei allen bedanken, die mich in irgendeiner Weise unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit in irgendeiner Form beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Achim Wixforth danken, dass er es mir ermöglicht hat, in diesem spannenden, interdisziplinären Umfeld zu wirken und zu forschen. Ich habe die mir gewährten Freiheiten und die vielseitige Förderung stets sehr genossen und geschätzt. Ebenso Danke ich PD Dr. Thomas Franke, der mir das Thema meiner Doktorarbeit eröffnet und der insbesondere auch durch intensive, fachliche Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Malte Peter, dafür dass er die Erstellung des Zweitgutachtens übernommen und mich gerade in der Endphase, bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation unterstützt hat.

Weiter möchte ich bei meinem ehemaligen Masterstudenten und mittlerweile Doktorandenkollege Benjamin Eggart für seinen vielseitige Unterstützung danken, insbesondere bei der Durchführung der Experimente im Rahmen seiner Masterarbeit und vor allem durch seinem immerwährenden Optimismus.

Bei Marion Steppich und Katharina Schneider möchte ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung der Aufnahmen am Elektronenmikroskop im Rahmen ihrer Zulassungsarbeiten bedanken und ebenso bei Robert Merkle vom AMU.

Bei meinen Kollegen und Kommilitonen aus der Arbeitsgruppe Mikrofluidik, insbesondere Lothar Schmid, M. Amin „Babak“ Fallah und Thomas Geislinger möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Ihr habt mir in vielen, vielen Diskussionen, Gesprächen, Experimenten und Unternehmungen Stärke und Kraft gegeben. Und fast im selben Atemzug möchte ich mich bei meinen Kollegen aus dem Raum 308, bei den G4+1, bei allen andern Mitgliedern des Lehrstuhls, die ich hier kennenlernen durfte, für ihre Kollegialität, für neue Freundschaften, für die einmalige Stimmung und das gute Arbeitsklima am Lehrstuhl bedanken.

Auch für die hervorragende technische und infrastrukturelle Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bedanken, besonders bei Alexander Hupfer, Sidonie Lieber und ebenso bei Funda Cevik.

Bei der *Nanosystems Initiative Munich* (NIM) möchte ich mich für die vielseitige und die weit über das rein wissenschaftlich hinausgehende Förderung im Rahmen des Graduiertenprogramms bedanken.

Abschließend möchte ich nun jenen Menschen meine große Dankbarkeit ausdrücken, die mich auf dem Weg zu und auch während meiner Promotion abseits von der Uni auf ihre Weise am meisten unterstützt haben. Das sind meine Eltern, die mir immer Halt und Zuversicht, Stärke und Kraft auf meinem Weg geben. Dasselbe gilt für meine Brüder mit ihren Partnern und Kindern. Und gilt ganz besonders für Dich, Stefan, ohne deinen Rückhalt und deine Unterstützung und ohne unsere gemeinsame Stärke und Kraft hätte ich das alles kaum vollenden können.

Lebenslauf

Name:	Braunmüller
Vorname:	Susanne
Geburtsdatum:	24.03.1981
Geburtsort:	Augsburg
09.1991 - 06. 2000	Wernher-von-Braun Gymnasium, Friedberg (Bayern)
10.2001 - 09.2003	Bachelorstudiengang Molecular Science, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Grundstudium mit abgeschlossener Vorprüfung)
10.2003 - 07.2005	Bachelorstudiengang Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilian-Universität München (Hauptstudium). Thema der Bachelorarbeit: <i>Anwendungen der CARS-Mikroskopie an lebenden Zellen</i>
10.2005 - 09.2007	Masterstudiengang Chemie, Ludwig-Maximilian-Universität München. Thema der Masterarbeit: <i>Viskoelastische Deformation roter Blutkörperchen</i>
11.2007 - 01.2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Durchführung der Promotion an der Universität Augsburg, Lehrstuhl für Experimentalphysik I
02.2011 - 03.2011	Forschungsaufenthalt an der Princeton University, NJ, USA