

# **Expression der Hitzeschockproteine 27, 60 und 70 in Leber und Gehirn bei Unterkühlungstodesfällen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Viktoria Bonda**

Aus Klausenburg, Rumänien

2022

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Burkhard Madea
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Becker

Tag der Mündlichen Prüfung: 17. August 2022

Aus dem Institut für Rechtsmedizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Madea

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1. Unterkühlung allgemein.....	9
1.2. Mikroskopische und Makroskopische Befunde.....	9
1.3. Heat Shock Proteine.....	11
1.3.1. HSP 27.....	13
1.3.2. HSP 60.....	15
1.3.3. HSP 70.....	16
1.4. Apoptose und Nekrose.....	18
1.4.1. Apoptose - Intrinsischer Signalweg.....	20
1.4.2. Apoptose - Extrinsischer Signalweg.....	21
1.5. Einfluss der HSP auf die Apoptose.....	23
1.6. Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	25
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.1. Das Studien-Kollektiv.....	26
2.2. Das Kontroll-Kollektiv.....	29
2.3. Entnahme und Aufbereitung des Schnittmaterials.....	32
2.4. Konventionelle und Immunhistochemische Färbemethoden.....	33
2.5. Avidin-Biotin-Methode und Färbeprotokoll.....	35
2.5.1. Prinzip.....	35
2.5.2. Durchführung und Färbeprotokoll.....	36
2.6. Auswertung.....	40
2.6.1. HE-Färbung.....	40
2.6.2. Immunhistochemie.....	41
2.6.3. Graduierung.....	46
2.6.4. Statistische Auswertung.....	47
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
3.1. Expression von HSP 70.....	50
3.2. Expression von HSP 27.....	50
3.2.1. Studienkollektiv HSP 27 Leber.....	50

3.2.2. Kontrollkollektiv HSP 27 Leber.....	51
3.2.3. Studienkollektiv HSP 27 Gehirn.....	51
3.2.4. Kontrollkollektiv HSP 27 Gehirn.....	51
3.3. Färbegrade von HSP 27.....	54
3.3.1. Färbegrade HSP 27 Leber.....	54
3.3.2. Färbegrade HSP 27 Gehirn.....	56
3.4. Expression von HSP 60.....	59
3.4.1. Studienkollektiv HSP 60 Leber.....	59
3.4.2. Kontrollkollektiv HSP 60 Leber.....	59
3.4.3. Studienkollektiv HSP 60 Gehirn.....	60
3.4.4. Kontrollkollektiv HSP 60 Gehirn.....	60
3.5. Färbegrade von HSP 60.....	63
3.5.1. Färbegrade HSP 60 Leber.....	63
3.5.2. Färbegrade HSP 60 Gehirn.....	63
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>68</b>
4.1. Das Fehlen von HSP 70.....	68
4.2. Unterschiedliche Expression von Hitzeschockproteinen.....	69
4.3. Der Einfluss von Rauschmitteln.....	76
4.4. Der Einfluss kardialer Schädigung.....	77
4.5. Expression von HSP 27.....	78
4.5.1. Expression von HSP 27 in der Leber.....	78
4.5.2. Färbegrade von HSP 27 in der Leber.....	78
4.5.3. Expression von HSP 27 im Gehirn.....	79
4.5.4. Färbegrade von HSP 27 im Gehirn.....	79
4.6. Expression von HSP 60.....	80
4.6.1. Expression von HSP 60 in der Leber.....	80
4.6.2. Färbegrade von HSP 60 in der Leber.....	81
4.6.3. Expression von HSP 60 im Gehirn.....	81
4.6.4. Färbegrade von HSP 60 im Gehirn.....	82
4.7. Limitationen.....	82
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>84</b>
<b>6. Anhang.....</b>	<b>86</b>

<b>7. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>96</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-Diphosphat
ACI	Arteria carotis interna
Akt	Für PKB codierendes Gen
AIF	Apoptosis inducing factor
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor 1
Ask1	Apoptosis signal-regulating kinase 1 (= MAP3K5)
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bad	Bcl-2 Antagonist of cell death (pro-apoptotisch)
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X-protein = Cofaktor des p53
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (Protein)
Bid	BH3 interacting domain death agonist (pro-apoptotisch)
BTM	Betäubungsmittel
CCT	tailless complex polypeptid 1
Daxx	Death domain associated protein
DNA	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure = DNS)
FADD	Fas-associated protein with death domain
Fas	(= Apo-1) > TNF-Rezeptor
HSP	Heat Shock Protein = Hitzeschockprotein
HSF	Heat Shock Factor
I $\kappa$ B $\alpha$	Transcription factor inhibitor $\kappa$ B $\alpha$
INTOX	Intoxikation

JNK-1	Januskinase 1
KAR	Kardiale Vorerkrankung
KH	Krankenhaus
KHK	Koronare Herzkrankheit
Ktl	Kontrolle
M.	Musculus
MAP	Mitogen-activated protein
MAPKAP	MAP kinase-activated protein
M <sub>UK</sub>	Median Unterkühlungsgruppe
M <sub>Ktl</sub>	Median Kontrollgruppe
NEF	Nucleotid-exchange factor
Neg	Negativ
NFκB	Transcription factor nuclear factor κB
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
Pos	Positiv
Q <sub>3(UK)</sub>	3. Quartil = 75%-Percentile Unterkühlungsgruppe
Q <sub>3(Ktl)</sub>	3. Quartil = 75%-Percentile Kontrollgruppe
PRAK	p38-regulated/activated protein kinase (= MAPKAP Kinase)
SAB	Subarachnoidalblutung
TNF	Tumor necrosis factor
TRiC	tailless complex polypeptid 1 ring complex
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TVT	Tiefe Beinvenenthrombose
UK	Unterkühlung
V.a.	Verdacht auf



## 1. Einleitung

### 1.1 Unterkühlung allgemein

Unterkühlung als Todesursache ist eine Diagnose, welche in Zusammenschau mehrerer vorliegender Befunde, makroskopischer sowie mikroskopischer Art, gestellt wird (Türk et al., 2005; Geserick et al., 2018). Von Unterkühlung spricht man, wenn die Körperkerntemperatur gleich oder weniger als 35 °C beträgt, fällt sie unter 27°C ist eine potenzielle Letalität gegeben (Madea et al., 2004). Den letztendlich zum Tode führenden Pathomechanismus stellt das bei einer Temperatur des Herzens von ca. 20°C einsetzende Kammerflimmern dar (Madea et al., 2004). Anhand der Forschung der 1940er Jahre ging man in der Vergangenheit von „innerem Ersticken“ als Todesursache infolge einer Linksverschiebung der Hämoglobin-Sauerstoff-Dissoziationskurve aus, es ließ sich im Lauf der Jahre allerdings feststellen, dass dies nur auf Unterkühlung im Trockenen und lang dauernder Kälteexposition zutrifft (Geserick et al., 2018; Hirvonen, 1976; Madea et al., 2004). Zudem trägt eine gewisse Vorbelastung des Organismus maßgeblich zur rascheren Ausbildung von Unterkühlungssymptomen bei. Zu beachten sind unter anderem systemische Vorerkrankungen wie Stoffwechselerkrankungen oder kardiale Vorbelastung sowie die Möglichkeit zum Ausbilden von Schutzreflexen oder Kältezittern, was durch eine Hemmung des zentralen Nervensystems beispielsweise durch exogene Noxen oder endogen vorliegende Schädigung sowie das Alter der Person beeinflusst wird (Madea et al., 2004).

### 1.2 Mikroskopische und makroskopische Befunde

In erster Linie und am geläufigsten sind die Wischnewski-Flecken zu erwähnen. Erstmals beschrieben 1885 von Wischnewski, stellen sie hämorrhagische Läsionen der Magenschleimhaut dar (Tsokos et al., 2006). Diese Befunde sind bei Untersuchungen von Unterkühlungsleichen in der Literatur als unterschiedlich häufig nachweisbar (12-100 %) beschrieben (Geserick et al., 2018). Makroskopisch sofort sichtbar und ein erster Hinweis auf eine Kälteexposition sind Forstbeulen durch Nekrosenbildung und Kälteerytheme.

Letztere entstehen durch eine intermittierende Vasodilatation nach initialer Vasokonstriktion und damit einhergehender Hyperämie in der Dermis des betroffenen Hautareals. Histologisch ist keine Erythrozytenextravasation zu finden, sodass es sich hierbei nicht um eine Blutung handelt. Klassischerweise sind die Akren betroffen, insbesondere Handrücken, Kniegelenkstreckseite und Unterschenkelaußenseite (Hirvonen J, 1976; Madea et al., 2004). Weitere auf Kälteexposition hinweisende Merkmale sind unter anderem die unterschiedliche Blutfarbe zwischen rechtem und linken Ventrikel des Herzens, Milzkontraktion, Verfettung der Tubulusepithelien der Niere, Einblutungen in die Muskulatur, insbesondere des M. iliopsoas, Pankreatitiden teils mit Fettgewebnekrosen und hämorrhagische Infarzierungen des Colon descendens (Madea et al., 2004; Mizukami et al., 1999; Preuss et al., 2007), welche allerdings als unspezifisch zu werten sind. Bereits 1914 zeigte Kjurkoff auf, dass Wischnewski Flecken auch durch Verbrennung, Hunger, Vergiftung, Hirnschädigung und Asphyxie hervorgerufen werden können (Geserick et al., 2018). Außerdem scheint deren Auftreten von unterschiedlichen Faktoren abzuhängen, wie der Länge der Kälteexposition vor Todeseintritt, der individuellen Stressreaktion und der Widerstandsfähigkeit der Magenschleimhaut (Bright et al., 2013; Geserick et al., 2018; Hirvonen, 1976). Bright et al. (2013) konnten in einem Versuch mit 42 Ratten aufzeigen, dass unter Einfluss kalter Temperaturen aber ohne maßgebliche Stressoren, also unter Versorgung mit ausreichend Nahrung, Wasser und Anästhesie, keines der Versuchstiere Wischnewski Flecken entwickelte, sodass Unterkühlung alleine scheinbar nicht ausreicht, um typische makroskopische Befunde auszubilden (Geserick et al., 2018). Ebenso muss beachtet werden, dass eine Unterkühlung im Wasser merklich schneller eintritt und damit die Agoniedauer verkürzt wird. Dies hat zur Folge, dass die bisher genannten Befunde fehlen können, wobei auch hier die Wassertemperatur und die damit korrelierende Dauer bis zum endgültigen Auskühlen eine Rolle spielen. So können bei eher milden Wassertemperaturen und damit einhergehender Agoniedauer von bis zu mehreren Tagen die gleichen Befunde wie bei einer Unterkühlung an der Luft gefunden werden (Madea et al., 2004). Letztendlich ist es von maßgeblicher Bedeutung, die Umgebung, in welcher die Leiche gefunden wurde, in Betracht zu ziehen, sodass eine Kombination aus allen genannten Faktoren schließlich zur korrekten Diagnose führt (Geserick et al., 2018; Hirvonen, 1976; Türk et al., 2005). So wurde der Begriff der Kälteidiotie geprägt, welche besagt, dass bei sinkender

Körpertemperatur ein paradoxes Wärmegefühl wahrgenommen wird, was eine komplette oder teilweise Entkleidung nach sich zieht. Hierbei werden bei Auffinden des entkleideten Leichnams die Kleidungsstücke meist verstreut vorgefunden, sodass die Szenerie von einem Sexualdelikt abgegrenzt werden muss. Die Auffindesituation ist von besonderer Bedeutung bei einer Unterkühlung (Madea et al., 2004). Als physiologischer Vorgang wird hier eine kältebedingte Paralyse der Blutgefäße versorgenden Nerven beschrieben, was zu einer stetigen Vasodilatation und somit einem kontinuierlichen Wärmegefühl führt, sowie die Sekretion des aktivierenden Hormons Adrenalin, was einen gesteigerten Metabolismus bedingt (Mizukami et al., 1999)

### 1.3 Heat Shock Proteine

Hypothermie ruft eine Stressreaktion des Körpers hervor, welche mit zellulärer Apoptose und somit der Expression von HSP, einem Chaperon, assoziiert ist (Ritossa, 1996). Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Menge an vorliegenden HSP und dem Grad der Thermotoleranz der Zelle nachgewiesen werden (Schlesinger, 1990). Hitzeschockproteine schützen die Zellen vor schädlichen Einflüssen, z.B. durch extreme Temperaturschwankungen, oxidativem und ischämischen Stress (Agashe et al., 2000; Feder, 1999; Sarto et al., 2000). Erstmals wurden sie 1974 in Drosophila Zellen beschrieben, sind aber in jeder Spezies zu finden und werden hinsichtlich ihres Molekulargewichtes in unterschiedliche Gruppen unterteilt (Feder, 1999; Schlesinger, 1990). Diese sind 5 HSP Familien, im Detail HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60 und kleine HSP mit 15-30kDa, wozu auch HSP 27 zählt. Die Funktionsweise unterscheidet sich ebenfalls je nach Größe des Proteins, so arbeiten Chaperone mit einem hohen Molekulargewicht ATP-abhängig und die kleinen HSP ATP-unabhängig (Garrido et al., 2006; Lanneau et al., 2008; Parsell and Lindquist, 1993). Die Aufgabengebiete von HSP wurden in zahlreichen Studien untersucht. Unter anderem konnte eine protektive Wirkung in Nervenzellen nachgewiesen werden, da die Abwesenheit der Chaperone mit einer gesteigerten Rate von z.B. neurodegenerativen Erkrankungen einhergeht und eine positive Korrelation zwischen Vorliegen von HSP und dem Überleben von Nervenzellen aufgezeigt werden konnte (Stetler et al., 2010). Die zytoprotektive Wirkung wurde für eine Vielzahl von Zelltypen untersucht, unter anderem steigern Ischämien, Traumata oder

Hyperthermie die Synthese von HSP in kardialem Gewebe, wobei z.B. das Vorliegen von HSP 70 einen zunehmenden Schutz insbesondere gegenüber ischämischem Stress darstellt (Santoro , 2000). Zudem konnte eine Schutzfunktion von stress-induzierbaren Proteinen gegenüber zellulärem Schaden in einem bestimmten Rahmen nachgewiesen werden, wohingegen zu intensive Exposition gegenüber Stress die Schutzmechanismen der Zelle überfordern können. Bei moderatem Stress fällt die HSP-Rate nach Beendigung des Reizes ab und die Zelle kann sich durch Wiedereintreten in die Zellsynthese vom Schaden erholen (Rossi et al., 2002). Demnach kann zwischen induzierbaren und nicht induzierbaren Hitzeschockproteinen unterschieden werden (Hartl FU, 1996; Parsell and Lindquist, 1993; Samali and Orrenius, 1998). Außerdem scheint sich die basale Expression von HSP je nach Zelltyp zu unterscheiden, unter anderem sind von Stetler et al. (2009) eine verminderte Expression in postmitotischen Zellen wie Neuronen aufgezeigt worden. In Urothel sind unter physiologischen Bedingungen HSP kaum nachweisbar, bei zellulärem Stress kommt es aber zu einer Induktion der Synthese (Rossi et al., 2002). Durch verschiedene exogene Faktoren (z.B. Umgebungsbedingungen) konnte eine variable Schwelle für die Induktion von HSP gezeigt werden, welche endogen verändert und angepasst werden kann (Feder, 1999).

Jedes Chaperon unterstützt die korrekte Faltung von neu gebildeten oder denaturierten Proteinen (Hemmingsen et al., 1988; Parsell and Lindquist, 1993). Zellstress verursacht die Denaturierung von Proteinen, was wiederum zur Bildung von Aggregaten und so konsekutiv zur Apoptose führt. Dies wird normalerweise durch HSP unterbunden, um das Überleben der Zelle zu sichern, entweder durch direkte Affektion der Apoptose oder durch Renaturierung von Proteinen mittels Faltung (Garrido, 2002; Hemmingsen et al., 1988; Hendrick and Hartl, 1993; Parsell and Lindquist, 1993; Schlesinger, 1990).

Es können konstant exprimierte und situativ induzierbare HSP unterschieden werden, wobei durch Zellstress hauptsächlich die Synthese von HSP 27 und 70 unter allen Chaperonen hervorgerufen wird. Unter physiologischen Bedingungen ohne Zellstress können auch konstant exprimierte Chaperone wie HSP 70 kaum oder nicht detektierbar sein (Feder, 1999; Hendrick and Hartl, 1993; Lanneau et al., 2008; Parsell and Lindquist, 1993). Außerdem kann die Menge des exprimierten HSP durch unterschiedliche Umstände verändert werden. Mit steigendem Alter einer Person steigt auch die Anzahl

der fehlgefalteten Proteine im Körper. Konsekutiv verringert sich die Fähigkeit der situationsabhängigen Expression von HSP und somit auch die Stresstoleranz. Die HSP sind immer weniger in der Lage den Effekt von zellulärem Stress zu mildern und damit steigt die Mortalität mit steigendem Alter unter stressbehafteten Konditionen (Feder, 1999).

### 1.3.1 HSP 27

HSP 27 ist als induzierbares, ATP-unabhängig arbeitendes Chaperon beschrieben, welches direkt die Apoptose durch Interaktion mit Cytochrom C beeinflusst und die Renaturierung fehlgefalteter Proteine unterstützt. Es befindet sich vor allem im Zytosol einer Zelle und kann bis zu 4 Wochen nach aufgetretenem zellulärem Stress nachgewiesen werden, da es ein spät induzierbares Protein darstellt. Es wird in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert und wirkt über Phosphorylierung durch Aktivierung von Phosphorylierungskaskaden (MAPKAP und PRAK) und Oligomerbildung (Currie et al., 2000; Garrido et al., 2001; Garrido, 2002; Lanneau et al., 2008; Parsell and Lindquist, 1993; Parcellier et al., 2003; Rossi et al., 2002; Sarto et al., 2000; Stetler et al., 2009). Hierfür notwendig zeigt sich der N-Terminus der Polypeptidkette, wogegen der C-Terminus durch enthaltenes Cystein in der alpha-Crystallin-Domäne in der Lage ist, Disulfidbrücken und damit stabile Dimere zu bilden (Haslbeck, 2002; Kim et al., 1998; Thériault et al., 2004; Van Montfort et al., 2001). Zudem ist die Oligomerbildung abhängig von der Phosphorylierung von HSP 27. Durch Stress und damit einhergehende Mediatoren, wie z.B. Cytokine, kommt es zum Einsetzen der MAP Kinase Kaskade und so zur Aktivierung von MAPKAP Kinase 2 und 3, welche wiederum direkt zur Phosphorylierung von HSP 27 beitragen (Garrido, 2002; Rogalla et al.). Mehlen et al. (1995) beschrieben eine maximale Phosphorylierung 30 Minuten nach einsetzendem Stimulus, welche nach einer Stunde nicht mehr nachweisbar war. Anschließend zeigte sich eine Akkumulation der phosphorylierten Isoformen, die nach zwei Stunden die maximale Ausprägung von 45 % der Proteine in gebundener Form bot (Mehlen et al., 1995). Als Wirkungsweise wurde durch die Phosphorylierung zudem eine gesteigerte Transkription von HSP 27 nachgewiesen, sodass durch eine erhöhte Anzahl an nicht nativen Proteinen die HSP Synthese steigt und durch einen Rückregulierungsmechanismus, bei dem HSP wieder in den Nucleus eintritt und durch

Bindung an HSF die Transkription hemmt, im weiteren Verlauf wieder verhindert wird (Santoro, 2000). Vor allem für HSP 27 wurde eine verstärkte Expression bei drohendem Zellschaden in Nervenzellen beschrieben, sodass hier eine stärkere neuroprotektive Funktion als bei anderen HSP angenommen wird (Latchman, 2005). So konnte HSP 27 in von neurodegenerativen Erkrankungen betroffenen Zellen, wie dem durch Amyloidablagerungen entstehenden Morbus Alzheimer, nachgewiesen werden. Bei Morbus Alzheimer kommt es zu einer Aggregation von Proteinen, was durch HSP 27 verhindert werden soll, indem es sich in dephosphoryliertem Zustand zu Oligomeren zusammenschließt, fehlgefaltete Proteine bindet, diese damit stabilisiert und eine Aggregation verhindert (Sharp et al., 2013). Zudem konnten tierexperimentell im Mausmodell eine signifikant gesenkte Mortalitätsrate sowie ein signifikanter Schutz vor Krampfanfällen in transgenetischen Tieren mit HSP 27 Überexpression aufgezeigt werden (Latchman, 2005). Unter physiologischen Bedingungen ist HSP 27 nur gering in allen Zelltypen des Gehirns nachweisbar und wird bei Stress hauptsächlich in den Astrozyten induziert (Sharp et al., 2000, 2013), wobei Leak et al. (2013) auch eine basale wie auch gesteigerte Expression von HSP 27 in mikrovaskulären Zellen und Endothelzellen zur Protektion der Blut-Hirn-Schranke fanden. Wird das Gehirn einer Belastung ausgesetzt, steigt der Nährstoffbedarf und die Durchblutung des Organs. Astrozyten bilden die Grenzmembran der Blutgefäße im zentralen Nervensystem und gewährleisten so die Versorgung der Neurone mit Nährstoffen aus dem Blut (Sharp et al., 2000, 2013). Außerdem haben sie im System eine Schutzfunktion, indem sie die Blut-Hirn-Schranke intakt halten, den Transport von Neurotransmittern regulieren und bei der Regeneration geschädigter Neurone mitwirken (Lüllmann-Rauch, 2009). Die Expression von HSP 27 in Endothel- und mikrovaskulären Zellen des Gehirns trägt zur Gewährleistung einer intakten Blut-Hirn-Schranke und somit Erhaltung der Integrität des Hirngewebes bei (Leak et al., 2013). Insgesamt scheint es einen höheren protektiven Effekt auf das zentrale Nervensystem aufzuweisen, als z.B. HSP 70. Im Tiermodell konnte zudem gezeigt werden, dass HSP 27 ebenso das zentrale Nervensystem vor Schäden schützt, wie Kardiomyozyten vor ischämischen Einflüssen (Latchman, 2005). Dai et al. (2016) führten eine Versuchsreihe mit Mäusen durch, in welcher eine protektive Wirkung von HSP 27 in Hepatozyten auf akut lebertoxische Substanzen bewiesen werden konnte. Insgesamt wirkt dieses Heat Shock Protein als wichtiger Schutzmechanismus in

unterschiedlichen Zelltypen und wird durch multiple endogene und exogene Faktoren induziert.

### 1.3.2 HSP 60

HSP 60, ein Chaperonin, liegt im Gegensatz zu anderen HSP vor allem im Mitochondrium vor, wobei es bis zu 15-20 % im Zytosol zu finden ist (Parcellier et al., 2003). Hier sorgt es für den korrekten Proteintransport zwischen der Organelle und dem Zytosol und unterstützt die Faltung von Mitochondrien assoziierten Proteinen. Das mitochondriale Chaperon besteht aus zwei Ringen mit je 7 Untereinheiten, welche jeweils hydrophobe Reste aufweisen und hierdurch mit denaturierten Proteinen interagieren können. Durch eine Konformationsänderung nach Proteinbindung wird eine „Faltungshöhle“ gebildet, in welcher fehlgefaltete Proteine ihre native Form erhalten (Motojima, 2015). Das Chaperonin kann ebenso im Endoplasmatischem Retikulum und Lysosomen nachgewiesen werden, enthält eine ATPase Untereinheit für die ATP-abhängige Funktion und ist essenziell für das Zellwachstum bei jeglichen Temperaturen. HSP 60 wird kontinuierlich in basalen Mengen exprimiert, wird aber durch Zellstress, insbesondere Hitze, induziert. Dem mitochondrialen HSP 60 wird eine pro-apoptotische Funktion zugeschrieben, das zytosolische scheint anti-apoptotisch zu wirken (Agashe et al., 2000; Garrido et al., 2001; Parcellier et al., 2003; Parsell and Lindquist, 1993; Schlesinger, 1990; Vargas-Parada et al., 2001b). In Gehirngewebe konnte die Expression von HSP 60 vermehrt in Astrozyten im Vergleich zu Neuronen gezeigt werden, sodass geschlussfolgert wurde, dass letztere eine verminderte Stressresistenz und damit auch Thermotoleranz aufweisen (Nishimura et al., 1991). Daneben wurde HSP 60 vor allem in Endothelzellen nachgewiesen, welche scheinbar hierdurch aktiviert werden (Ranford et al., 2000). Ranford et al. (2000) beschrieben in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen nachweisbares HSP 60 an der Zelloberfläche nach Freisetzung aus der Zelle, was eine Interaktion mit verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Leukozyten, vaskulärem Endothel und Epithelzellen, nach sich zieht und so unterschiedliche Funktionen, darunter auch protektive Prozesse, induziert. HSP 60 scheint nahezu keine Affinität gegenüber nativen Proteinen aufzuweisen und unterstützt bei sich normalisierenden Temperaturen die Renaturierung von durch Hitzeeinfluss fehlgefalteten Proteinen, teils unter Zuhilfenahme von weiteren Co-Chaperoninen (Parsell and Lindquist, 1993) . Studien zum Einfluss von

HSP 60 auf die Leber, insbesondere in Zusammenhang mit Leberschädigung durch Noxen, sind kaum zu finden.

Darüber hinaus ist in Eukaryoten zudem das im Zytosol vorkommende CCT oder auch TRiC, ein Chaperon der HSP 60 Familie, zu finden, welches eine ähnliche Struktur wie das mitochondriale HSP 60 aufweist. Es ist ein aus zwei Ringen mit je acht Protein-Untereinheiten aufgebautes Hetero-Oligomer, wobei die unterschiedlichen Untereinheiten spezifische Substratbindungsstellen aufweisen. Diese bilden strukturell ein „Fass“ mit Boden und Deckel, welche einen abgetrennten Raum zur Proteinfaltung darstellen (Grantham, 2020; Kim et al., 1994; Yam et al., 2008). Daneben weisen die Untereinheiten von TRiC als Monomere weitere Funktionen auf, unter anderem das direkte Verhindern einer Aggregation nicht löslicher Proteine. Mit zunehmendem Alter konnte eine rückläufige Expression von TRiC nachgewiesen werden, ebenso bei Morbus Alzheimer (Grantham, 2020). Das Substrat wird an hydrophoben Sequenzen durch ebenfalls hydrophobe Bereiche des Oligomers erkannt und erfährt nach Bindung eine Konformationsänderung in seine native Form. Es konnte vor allem eine große Anzahl von beta-Faltblatt Struktur der Substrate nach Faltung nachgewiesen werden, sodass der Kanal des Oligomers eine stabile Faltung in die energetisch ungünstige Sekundärstruktur unterstützt (Yam et al., 2008). Unter ATP-Verbrauch wird das gefaltete Substrat wieder entlassen (Kim et al., 1994). Als hauptsächliches Substrat für TRiC dienen Actin und Tubulin als Bestandteile des Zytoskeletts, wobei je nach Organ unterschiedliche Mengen an TRiC in der Zelle zu finden sind. So stellt es ca. 1% der zytosolischen Proteine im Hoden dar, ist in hohem Maße auch in embryonalen Zellen sowie in lymphoiden Zellen zu finden, wenig dagegen in Leber und Gehirn (Grantham, 2020; Kim et al., 1994; Yam et al., 2008). Außerdem wird die Aktivität von TRiC nicht durch Hitze oder Stress induziert (Kim et al., 1994).

### 1.3.3 HSP 70

HSP 70 ist ebenfalls als ATP-abhängig mit der Funktion, fehlgefaltete Proteine zu renaturieren, beschrieben. Physiologischerweise wird es konstant im Körper in gewissem Maß exprimiert und liegt in nahezu jedem Zelltyp vor, einerseits im Zytosol und andererseits im Endoplasmatischen Retikulum, ist allerdings in seiner physiologischen Quantität kaum nachweisbar (Parsell and Lindquist, 1993; Schlesinger, 1990). Das Enzym enthält zwei Bindungsdomänen, eine C-terminale Peptidbindungsdomäne und die N-



terminale ATPase-Domäne. Der Zugang zur Peptidbindetasche wird ATP-abhängig gesteuert (Hartl FU et al., 2002). Wird ATP gebunden, wurde durch Mayer (2010) eine geringe Affinität zum Substrat und somit eine gesteigerte Umsetzungsrate beschrieben, wird aber ADP gebunden, so ergibt sich folglich eine höhere Substrataffinität und eine geringere Wechselrate. Bei Bindung von ATP ist der Zugang also „offen“, bei ADP-Bindung „geschlossen“. Gebunden wird das Substrat auch hier durch hydrophobe Bereiche, welche nach korrekter Konformationsänderung verborgen werden. Durch den Nucleotid-exchange factor (NEF) wird ADP abgespalten und neues ATP kann binden, sodass es zur Freisetzung des gebundenen Substrates kommen kann, sofern die Faltung richtig abgelaufen ist (Hartl FU et al., 2002). Es sind zahlreiche Funktionen des Chaperons bekannt, darunter die direkte Suppression der Apoptose, das Binden an Substrate während der Stress-induzierten Entfaltung, Unterstützung des Zellwachstums, Translokation von Vorläufer-Proteinen und der Zellentwicklung durch Augmentation der Proteinfaltung nach Synthese dieser Proteine. Zudem kann die Affinität zu bestimmten Substraten durch den Einfluss von sogenannten Co-Chaperonen reguliert werden. Für die Funktion bindet HSP 70 neben ATP auch Glucose und ist daher lediglich 1-4 Tage nach zellulärem Stress noch nachweisbar, sodass das Vorhandensein ein Indikator für kürzliche Zellschädigung sein kann (Beere et al., 2000; Currie et al., 2000; Flaherty et al., 1990; Garrido et al., 2006; Hendrick and Hartl, 1993; Parsell and Lindquist, 1993; Schlesinger, 1990). Nach eintretendem Zellstress ist HSP 70 ein rasch induzierbares Protein und stellt somit eine frühe Instanz der Zellprotektion dar (Parcellier et al., 2003). Im zentralen Nervensystem konnte bereits 10 Minuten nach ischämischen Stress eine Expression von HSP 70 im betroffenen arteriellen Gefäß sowie dem direkten umliegenden Nervengewebe nachgewiesen werden (Sharp et al., 2013). Hier zeigte sich eine basale Expression v.a. in neuronalen Zellen. Bei Zellstress, wobei den hauptsächlichsten Stimulus denaturierte Proteine darstellen, wurde HSP 70 hauptsächlich in Neuronen und Gliazellen nachgewiesen. Sharp et al. (2000, 2013) zeigten eine gesteigerte Expression im Falle einer ischämischen Schädigung nicht nur im direkt betroffenen Gewebe, sondern im Verlauf auch in den umliegenden Zellen. Insgesamt konnte eine verminderte Proliferationsrate von Zellen mit einem geringeren Anteil an HSP 70 aufgezeigt werden sowie eine signifikant geringere Thermotoleranz nach Elimination dieses HSP und somit

ein gesteigertes Überleben der Zellen angesichts extremer Temperatureinflüsse bei Überexpression von HSP (Parsell et al., 1993).

#### 1.4 Apoptose und Nekrose

Unterkühlung stellt einen externen Stressfaktor für die Zellen eines Organismus dar, ebenso wie Hitze, oxidativer Stress, physische Schäden etc. Das führt zur Einleitung des programmierten Zelltodes, der Apoptose. Der Begriff Apoptose wurde 1972 durch Kerr, Wyllie und Currie eingeführt (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972; Pfeifer et al., 2008). Der Mechanismus stellt den Gegenpart der Mitose dar und erfüllt bestimmte morphologische und biochemische Kriterien. Sie spielt nicht nur eine wesentliche Rolle bei der Beseitigung von Zellen nach exogener oder endogener Schädigung, sondern ist auch wichtiger Bestandteil von physiologischen Entwicklungsprozessen, wie der Embryogenese, Alterungsprozessen, der Funktion des Immunsystems oder der Hämatopoese (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972). Der Vorgang unterliegt genetischer Kontrolle und kann durch verschiedene interne und externe Stimuli ausgelöst werden. Diese können negativ sein, wie die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Zytokinen, und positiv, wie zum Beispiel Strahlung, Toxine, thermische Einflüsse, Infektionen oder freie Radikale (Elmore, 2007). Morphologisch ist eine Zellschrumpfung und -verdichtung zu beobachten, nur selten kommt es zu Karyorhexis, zudem schwellen die Organellen nicht oder nur wenig und die DNA wird in Segmente mit chemisch spezifischen Enden gebrochen, sodass diese gezielt und kontrolliert abgeräumt werden kann (Majno und Joris, 1995). Die geschrumpften Zellen bezeichnet man als Apoptosekörperchen, welche durch Verlagerung von Phosphatidylserin an ihre Oberfläche gewährleisten, dass sie durch Makrophagen erkannt und anschließend abgebaut werden können (Pfeifer et al., 2008). Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose Energie-abhängig und beginnt nach längerfristigem Zellstress, wogegen die Nekrose bei kurzem, sehr intensiven Reiz aktiviert wird (Majno und Joris, 1995). Von Nekrose spricht man, wenn während des Zellunterganges die Merkmale der Apoptose nicht vorliegen. Sie ist stets ein pathologisch auftretender, passiver und unkontrollierter Vorgang und betrifft keine einzelne Zelle, sondern einen größeren Zellverband (Elmore, 2007). Die Nekrose schädigt im Gegensatz zur Apoptose auch das umliegende Gewebe durch Freisetzung von Zellbestandteilen und

Aktivierung einer Inflammationsreaktion, wodurch die Voraussetzungen für Regeneration oder Reparatur geschaffen werden sollen. Die Apoptose führt zu einer Zellschrumpfung, in deren Rahmen die Zellmembran intakt bleibt. Die apoptotische Zelle wird anschließend von Makrophagen abgeräumt, sodass es nicht zu einer Aktivierung der Inflammationsreaktion kommt (Kurosaka et al., 2003; Pfeifer et al., 2008). Im Falle der Nekrose kommt es zu einer Schädigung der Zellmembran, sodass Zytosol und weitere Zellbestandteile in umliegende Areale freigesetzt werden und somit eine Inflammationsreaktion mit massiver Einwanderung von neutrophilen Granulozyten aktivieren. Folglich werden bei der Apoptose lediglich die betroffenen Zellen in den kontrollierten Zelltod geleitet und durch lysosomale Prozesse von Makrophagen abgebaut, die Nekrose allerdings führt zu einem nicht kontrollierbaren Untergang umliegender Zellverbände. Apoptose und Nekrose sind eigenständige Vorgänge, können aber auch gleichzeitig ablaufen. So wird im Randbereich von nekrotischen Zellverbänden in einzelnen Zellen die Apoptose aktiviert (Elmore, 2007; Pfeifer et al., 2008). Die morphologischen Merkmale der Nekrose sind die irreversible Veränderung des Nucleus (Karyolyse, Pyknose und Karyorhexis) sowie des Zytoplasmas (Kondensation, Eosinophilie und Strukturverlust), welche durch multiple externe Einflüsse initiiert werden können und zugleich die Nekrose selbst induzieren (Majno und Joris, 1995). Dieser Zustand wird als „point of no return“ bezeichnet und ist z.B. in Leberzellen nach etwa 150 Minuten erreicht, wobei die nekrotischen Veränderungen des Gewebes erst nach etwa 12-24 Stunden vollständig sichtbar sind (Majno und Joris, 1995).

Die Apoptose läuft organisiert ab und ist ein natürlicher Bestandteil des Lebenszyklus einer Zelle, wobei nicht jede Zelle auf den selben Stimulus mit Einleitung der Apoptose reagiert (Elmore, 2007). Auf molekularer Ebene wird unterschieden zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Signalweg. Beide führen schlussendlich zur Aktivierung einer gemeinsamen Endstrecke, der Caspasen-Kaskade und damit zum Untergang der Zelle, werden aber auf unterschiedlichen Wegen aktiviert (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972; Kurosaka et al., 2003; Majno und Joris, 1995). Caspasen (Cysteine-dependent aspartate-specific Proteases) gehören zur Gruppe der Proteasen, welche inaktiviert als Vorläufer, sog. Pro-Caspasen vorliegen und durch kaskadenartige Aktivierung die hauptsächlichen Mediatoren des programmierten Zelltodes darstellen (Netzker, 2008). Die Caspasen-Kaskade besteht aus Proteinen mit unterschiedlicher

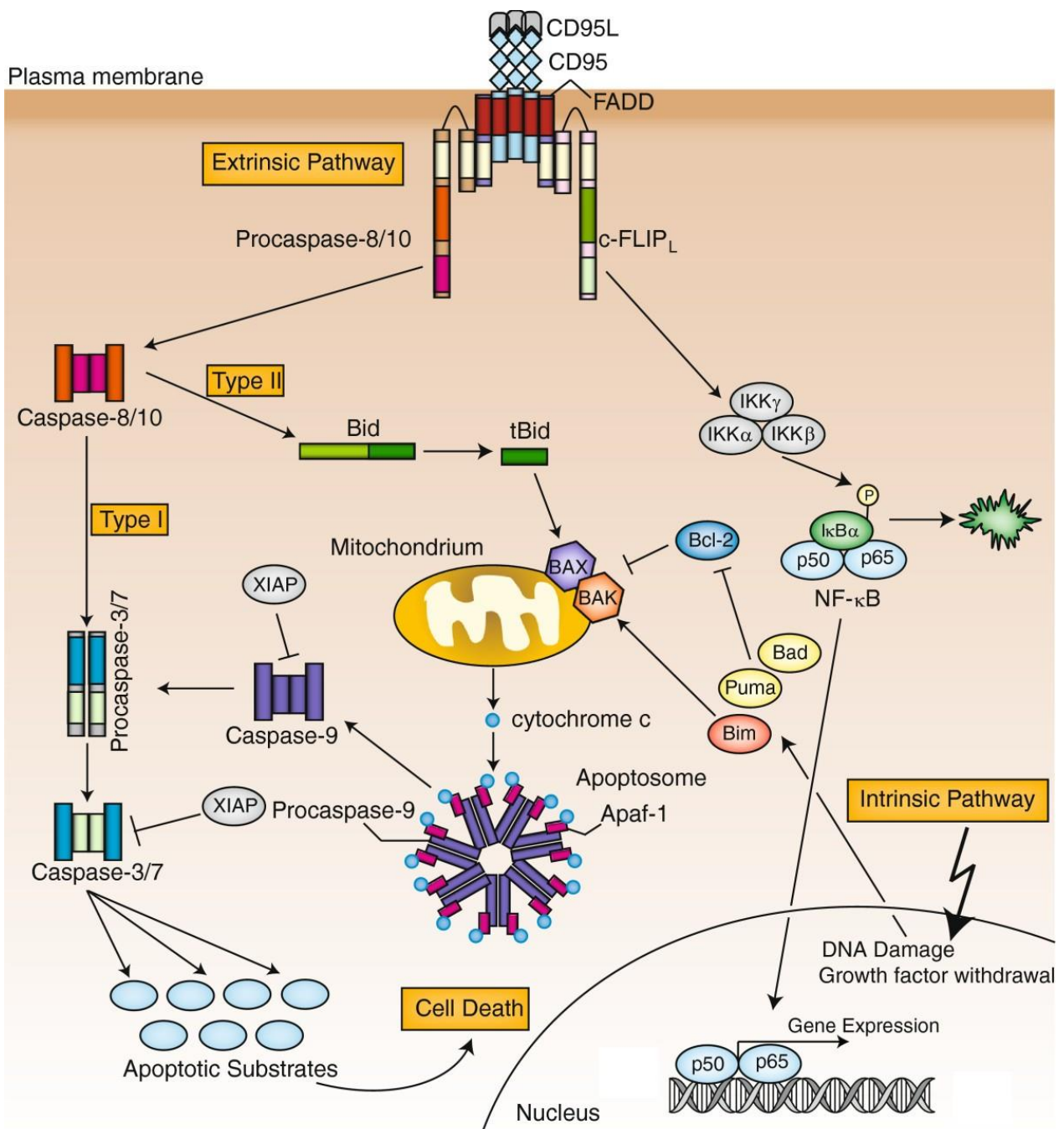
Nummerierung, wobei am Ende die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 stehen und nach Aktivierung unweigerlich zum Zelltod führen (Elmore, 2007).

#### 1.4.1 Apoptose - Intrinsischer Signalweg

Dieser Signalweg wird durch intrazelluläre Stimuli (z.B. DNA-Schäden oder oxidativen Stress) initiiert. Hierbei kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung der Mitochondrienmembran zum Beispiel durch die Einwirkung von Kalzium-Ionen oder von Sauerstoffradikalen. Proteine der Bcl-2-Familie wirken regulierend und können sowohl antiapoptotisch, indem sie eine Permeabilitätssteigerung verhindern, oder proapoptotisch im Falle von Bax durch Steigerung der mitochondrialen Permeabilität fungieren (Pfeifer et al., 2008). Es werden pro-apoptotische Moleküle produziert, welche mit Mitochondrien konvergieren und zur Freisetzung apoptotischer Substanzen aus den Organellen sorgen. Eines davon stellt Cytochrom C dar, ein Protein, welches physiologisch in den Mitochondrien vorkommt und am Ablauf der Atmungskette beteiligt ist (Bertini et al., 2006). Dieses bindet nach Freisetzung an Apaf-1 (apoptotic protease activation factor) und an Pro-Caspase-9, wodurch ein Apoptosom gebildet wird. Das Apoptosom bildet den Caspase-3-Aktivierungs-Komplex und führt damit zum finalen Schritt, die Aktivierung der Caspasen-Kaskade, was den endgültigen Zelltod einleitet (Lanneau et al., 2008; Latchman, 2005). Des Weiteren transloziert AIF (apoptosis inducing factor) bei apoptotischem Stimulus aus der Mitochondrienmembran zum Zellkern und triggert dort Caspase-unabhängige morphologische Veränderungen, welche wiederum den programmierten Zelltod zur Folge haben können. Weitere freigesetzte mitochondriale Proteine, wie Smac/Diablo und Htra2/Omi neutralisieren die Funktionen von IAPs (inhibitory apoptotic proteins), welche wiederum Caspasen inhibieren und somit die Apoptose aktivieren. Endonuklease G, ein Intermembranprotein des Mitochondriums, wird auf apoptotische Signale freigesetzt, durch Caspase-3 aktiviert und wirkt als DNase, also ein Enzym, was im Rahmen eines eingeleiteten Zerstörungsprozesses zu einer Degradation der nukleären DNA sowie einer Chromatinaggregation führt (Elmore, 2007; Garrido et al., 2006).

#### 1.4.2 Apoptose - Extrinsischer Signalweg

Der extrinsische Weg funktioniert mithilfe sogenannter „Todes-Rezeptoren“. Diese stellen Plasmamembran-Proteine der TNF-Rezeptor Familie dar. Sie bestehen alle aus einer extrazellulären, ähnlich aufgebauten Cystein-reichen Domäne und einer intrazellulären, im Zytosol befindlichen sogenannten „Todesdomäne“, welche aus etwa 80 Aminosäuren aufgebaut ist (Elmore, 2007). Sie werden durch Bindung z.B. eines Fas-Liganden auf der Oberfläche von T-Zellen aktiviert und führen zur Bindung des Adapterproteins FADD. Hierbei wird der „Death-inducing signalling complex“ (DISC) funktionsfähig, indem es zwischen Procaspase-8 und FADD zur Dimerbildung kommt, was eine direkte Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Caspasen 3, 6 und 7) bewirkt und über ein zwischengeschaltetes Protein (Bid), welches von Caspase-8 gespalten wird, über die Mitochondrien den intrinsischen Signalweg parallel dazuschaltet. Außerdem werden durch die Bildung des DISC weitere Procaspase-8 autokatalytisch aktiviert und damit weitere Caspase-8 gebildet, was zu einer signalverstärkenden Rückkopplungsreaktion führt (Elmore, 2007; Garrido et al., 2006; Lanneau et al., 2008).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der zellulären Apoptose, möglich ist die Einleitung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges mit Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden. Beide Wege münden in der gleichen Endstrecke. Entnommen aus: „Mathematical modeling of Apoptosis“ von *Schleich und Lavrik (2013)*

## 1.5 Einfluss der HSP auf die Apoptose

Die Aktivierung der Apoptose und die Expression von HSP werden durch die gleichen Einflüsse und Stimuli getriggert (Parcellier et al., 2003). Heat Shock Proteine wiederum können die Apoptose sowohl direkt als auch indirekt beeinflussen und wirken hierbei über Interaktion mit dem intrinsischen und dem extrinsischen Signalweg (Garrido et al., 2001) (Abbildung 1). Einige HSP haben direkten Einfluss auf die Apoptose durch kompetitive Bindung an essentielle Proteine des Signalweges, andere bewirken durch indirekten Einfluss auf Proteine, welche auf die Apoptose Einfluss nehmen, eine Regulation des programmierten Zelltodes (Garrido et al., 2006). Die Apoptose wird hauptsächlich inhibiert durch Stimulation von IAP, Steigerung der Caspasen-Inhibierung und Stimulation von PKB/Akt sowie durch Inhibierung von Bcl-2-Proteinen (Elmore, 2007).

HSP 27 zum Beispiel kann die Bildung des Apoptosoms verhindern. Außerdem bedingt es die Sequestrierung von Cytochrom C nach Freisetzung ins Zytosol, wobei dieser Vorgang unabhängig von der Phosphorylierung von HSP 27 geschieht. Zudem wird in erster Linie die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium selbst gehemmt (Stetler et al., 2009). Gleichzeitig wird durch HSP 27 die proteasomale Degradation fehlgefalteter Proteine gesteigert und damit die Aggregation verhindert (Stetler et al., 2009). Es stabilisiert als weitere Funktion Aktin-Mikrofilamente, was scheinbar mit der Caspasen-Aktivierung zusammenzuhängen scheint und stabilisiert in seiner phosphorylierten Form die reduzierte Form von Glutathion, was die Neutralisierung oxidativer Proteine nach sich zieht und so die Zellen vor oxidativem Schaden schützt. Die Chaperon-Funktion wird in Form von dephosphorylierten Oligomeren ausgeübt, z.B. gegen ischämische Schäden (Stetler et al., 2009). Außerhalb von Zellen des Nervensystems tritt HSP 27 als Hemmer der Interaktion zwischen Pro-Caspase 9 und Cytochrom C auf und bindet an Pro-Caspase 3, sodass dieses nicht zu Caspase 3 umgewandelt werden kann. Außerdem wird der pro-apoptotische JNK-Signalweg durch die Inhibierung von Ask 1 mithilfe von phosphoryliertem HSP 27 supprimiert und der anti-apoptotische Weg von Akt/PKB aktiviert (Leak et al., 2013; Sharp et al., 2013). Darüber hinaus bedingt HSP 27 die selektive Ubiquitylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , was zu einem Anstieg von NF $\kappa$ B in den Zellen führt und damit den protektiven Effekt des Chaperons unterstützt, sowie von p27<sup>kip1</sup>, sodass Zellen in der S-Phase der Mitose verharren und bei Beendigung

der Stressreaktion schneller proliferieren können. Des Weiteren aktiviert HSP 27 Akt, was seinerseits zur Phosphorylierung von HSP 27 führt und mit Bad und Caspase-9 interagiert. Die phosphorylierte Form von HSP 27 interagiert mit Daxx, einem Protein, was normalerweise über Fas und Ask1 zum Caspase unabhängigen Zelltod führt, sodass genau dieser Prozess verhindert wird (Garrido et al., 2006).

HSP 60 kann gegensätzlichen Einfluss auf die Apoptose nehmen. Das mitochondriale HSP 60 hat eine pro-apoptotische Funktion, indem es Pro-Caspase 3 zu Caspase 3 aktiviert und damit den programmierten Zelltod unterstützt. Das zytosolische HSP 60 wirkt anti-apoptotisch, indem es zwei Bcl-2 verwandte Proteine (Bax und Bak) bindet und damit deren Translokation ins Mitochondrium hemmt (Parcellier et al., 2003).

HSP 70 nimmt auf mehreren verschiedenen Wegen auf die Apoptose Einfluss. Unter anderem aktiviert es Proteinkinasen, kann freie Radikale generieren, unterbricht das mitochondriale Transmembranpotenzial und sorgt somit für die Freisetzung von Cytochrom C und aktiviert direkt Caspase-3-ähnliche Proteasen (Jäättelä et al., 1998). Genauer betrachtet bindet HSP 70 an JNK1 und inhibiert dieses, wodurch der Bid-abhängige Apoptoseweg gehemmt wird. Zudem bindet es an nicht-phosphorylierte PKB und PKC und stabilisiert diese in rephosphorylierter Form. HSP 70 kann den hitzeinduzierten Zelltod verhindern, indem es die Translokation von Bax aus dem Mitochondrium verhindert und somit die Insertion in die äußere Mitochondrienmembran mit konsekutivem Anstieg der Permeabilität vereitelt wird, sodass Cytochrom C und AIF nicht freigesetzt werden können. An AIF kann HSP 70 zudem auch direkt binden, sodass es zu keiner Kondensation des Chromatins kommt. Des Weiteren bindet HSP 70 an Apaf-1, wodurch es die Bildung des Apoptosomen inhibiert, und kann auch direkt mit Procaspase-3 und -7 interagieren. Dieses Chaperon ist unter anderen HSP noch in am weitest fortgeschrittenen Phasen der Apoptose aktiv. So kann es die Aktivierung der Phospholipase A2 unterdrücken und die DNase CAD binden. Außerdem beeinflusst HSP 70 die Permeabilisation der Lysosomenmembran und verhindert somit die Freisetzung von Cathepsinen, also weiteren Proteasen, aus diesen Zellorganellen (Garrido et al., 2006; Jäättelä et al., 1998).



## 1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Wie ausführlich dargestellt, gibt es einen Zusammenhang zwischen zellulärem Stress und der Expression von Heat Shock Proteinen, wobei bislang nur wenige Untersuchungen hinsichtlich des Vorliegens bei Unterkühlung als Stressor existieren. Zudem kann laut Literatur bislang lediglich auf Basis verschiedener makroskopischer Veränderungen während der Obduktion auf eine Unterkühlung als Todesursache geschlossen werden, wobei diese unterschiedliche Spezifität und Sensitivität aufweisen. Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit der folgenden primären Fragestellung:

Gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Todesursache Unterkühlung und der Expression von HSP 27, 60 und 70 hier mit besonderem Augenmerk auf Leber und Gehirn, sodass durch das Vorliegen eine eindeutige Diagnose möglich ist?

Hierfür werden die Organe einer immunhistochemischen Untersuchung unterzogen und sowohl das qualitative als auch das quantitative Vorliegen von HSP betrachtet. Da in der Literatur multiple Faktoren nachgewiesen werden konnten, die eine Expression von HSP bedingen, werden hier auch weitere Einflussfaktoren berücksichtigt, sodass neben der primären Fragestellung sich folgende Untersuchung ergibt:

Inwieweit konkurrieren bestimmte Vorerkrankungen und weitere Faktoren mit der HSP-Expression und welchen Einfluss haben diese insbesondere bei diagnostizierter Unterkühlung auf die HSP Nachweisbarkeit?

Aufgrund der multiplen Einflussfaktoren auf die HSP Expression ergibt sich zudem noch die Überlegung:

Gibt es einen Zusammenhang zwischen Unterkühlung und dem quantitativen Nachweis von HSP in Leber- und Gehirnzellen als Hinweis auf die Todesursache?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Das Studienkollektiv

In dieser Studie wurde Leber- und Hirngewebe von Fällen untersucht, deren Todesursache nach der Obduktion im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn als Unterkühlung festgelegt werden konnte. In 2 Fällen ist die Todesursache als ungeklärt aufgeführt, allerdings fanden sich trotz der nicht eindeutig passenden Auffindsituation makroskopische Hinweise am Leichnam, welche auf eine Kälteeinwirkung hindeuten, sodass letztendlich von einer letalen Hypothermie oder zumindest von Unterkühlung als begleitende Todesursache auszugehen ist.

Die Probenentnahme erfolgte aufgrund der Feststellung von Wischnewski-Flecken, also hämorrhagischen Unterblutungen der Magenschleimhaut, Kälteerythemen in der Dermis oder der Kenntnis der Fundsituation mit entsprechender Außentemperatur und Liegezeit.

Es fanden sich insgesamt 70 Unterkühlungsfälle aus den Jahren 2006-2016, von denen nach Berücksichtigung von Fäulnis und Liegezeit über 1 Monat eine bereinigte Zahl von 53 Fällen mit einem durchschnittlichen Lebensalter zum Todeszeitpunkt von 66,25 Jahren für die Auswertung blieb.

In der Tabelle 1 wird das Unterkühlungskollektiv mit Geschlecht, Alter, Auffindeort, Todesmonat, Liegezeit und falls bekannt Vorliegen einer kardialen Vorbelastung und einer aktuellen Intoxikation mit Alkohol und/oder Drogen oder aus der Vorgeschichte bekanntem regelmäßigem Konsum aufgezeigt. Als kardiale Vorbelastung wurden anamnestisch festgehaltene bzw. in der Obduktion nachweisbare KHK, bereits abgelaufene kardiale Ischämien sowie eine beschriebene oder anhand makroskopischer Befunde sichtbare Herzinsuffizienz definiert. Diese Besonderheiten stellen Konstitutionen und Verhalten dar, welche laut Literatur besonders mit Unterkühlungssituationen assoziiert sind, wie zum Beispiel Suchtverhalten, Rauschmittelkonsum oder fehlende Kompensationsmechanismen aufgrund bereits vorliegender Erkrankungen (Madea et al., 2004). Die Daten wurden durch die Obduktionsprotokolle, die vorliegenden Polizeiberichte und Krankheitsgeschichte zusammengetragen und ausgewertet.

**Tab. 1:** Zusammenstellung der Merkmale des Unterkühlungskollektivs (Geschlecht, Alter, Auffindeort und -monat, bekannte kardiale Belastung, Intoxikation mit Alkohol oder Drogen, Liegezeit), Zusammengetragen aus Obduktionsprotokollen des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Bonn

	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auffindeort</b>	<b>Monat</b>	<b>Kardiale Vorbelastung</b>	<b>Intoxikation</b>	<b>Liegezeit</b>
1	m	76	Wald	Februar	positiv	-	2 Tage
2	m	60	zu Hause	März	positiv	positiv	max. 14 Tage
3	m	58	zu Hause	Juni	-	-	5 Tage
4	m	43	zu Hause	Dezember	positiv	positiv	unbekannt, max. 5 Wochen
5	w	76	zu Hause	Januar	-	-	ca. 14 Tage
6	w	92	zu Hause	Januar	-	-	1 Tag
7	m	44	Hinterhof Garagenpark	Januar	positiv	-	< 6 Stunden
8	w	44	Wald	Februar	-	-	1 Tag
9	m	59	Bach	Februar	-	positiv	4 Tage
10	m	9	im Krankenhaus	April	-	-	0 Tage
11	m	63	zu Hause	April	-	positiv	3 Tage
12	w	88	Innenhof	Dezember	-	-	Stunden
13	w	31	abgelegene Garage	Januar	-	-	unbekannt, länger
14	w	55	zu Hause	Februar	-	positiv	1 Stunde
15	w	86	zu Hause	September	positiv		wenige Stunden
16	w	62	zu Hause	November	-	positiv	1 Tag
17	m	89	zu Hause	November	positiv	-	unbekannt
18	w	78	zu Hause	November	-	positiv	wenige Stunden
19	w	80	auf Terrasse	November	positiv	-	mehrere Stunden
20	w	53	auf Parkbank gefunden	Februar	-	-	unbekannt, max. 4 Wochen
21	m	66	im Beet im Garten	Februar	positiv	positiv	Stunden
22	m	71	zu Hause	Februar	-	positiv	4 Stunden
23	m	67	zu Hause	März	-	positiv	unbekannt
24	w	70	Gebüsch am Rhein	Oktober	-	positiv	max. 5 Tage
25	m	76	Terrasse	November	positiv	positiv	Stunden
26	w	50	PKW	Dezember		positiv	Stunden
27	w	71	zu Hause	Januar	positiv	-	Stunden

	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auffindeort</b>	<b>Monat</b>	<b>Kardiale Vorbelastung</b>	<b>Intoxikation</b>	<b>Liegezeit</b>
28	m	50	Bachlauf (kein Wasser)	Februar	positiv	positiv	wenige Stunden
29	w	97	zu Hause bei offener Balkontür	Februar	-	positiv	wenige Stunden
30	w	76	zu Hause	Februar	positiv	positiv	unbekannt, max. 14 Tage
31	w	81	zu Hause	September	positiv	-	1 Woche
32	m	87	zu Hause	September	positiv	-	wenige Stunden
33	w	71	zu Hause	Oktober	-	positiv	4 Tage
34	w	83	zu Hause	Dezember	positiv	-	wenige Tage
35	m	58	zu Hause	Mai		positiv	ca. 7 Tage
36	w	84	Krankenhaus	September	positiv	positiv	0 Tage
37	m	53	zu Hause	September	positiv	positiv	1 Tag
38	w	88	zu Hause	Oktober	positiv	-	einige Stunden
39	m	41	auf Bank in Holzhütte	November	-	-	unbekannt, max. 10 Tage
40	m	58	öffentlich	März	-	positiv	Stunden
41	m	86	am Fuße einer Böschung	März	positiv	-	unbekannt, max. 2 Wochen
42	m	57	Wohnung	Juni	positiv	positiv	wenige Stunden
43	w	60	zu Hause	August	positiv		1 Tag
44	m	24	Bach im Wald	Dezember	-	positiv	Stunden
45	w	85	zu Hause	Januar	positiv	-	2 Tage
46	m	71	zu Hause	Januar/Februar	positiv	-	3 Wochen
47	m	65	unterkühlt zu Hause, verstorben im KH	Februar	positiv	-	0 Tage
48	m	84	zu Hause	Mai	positiv	positiv	ca. 12 Stunden
49	w	58	zu Hause	September	-	positiv	unbekannt, max. 7 Tage
50	w	92	zu Hause	Oktober	-	positiv	mind. 6 Stunden
51	w	66	zu Hause	Januar	positiv	-	ca. 4 Tage
52	m	49	zu Hause	Januar	-	positiv	10 Tage
53	w	70	zu Hause	Januar	-	-	12 Tage

## 2.2 Das Kontrollkollektiv

Es handelt sich bei dem Kontrollkollektiv ausschließlich um Fälle aus dem Jahre 2009 mit unterschiedlichen bekannten Todesursachen und ohne unterkühlungsspezifische makroskopische Befunde oder Auffindesituationen. Die Todesursachen sind vielfältig, wobei die häufigsten Ursachen kardiales Versagen und Drogen- bzw. Alkoholintoxikation darstellt. Genauere Angaben sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Es lagen insgesamt 54 solcher Fälle als Kontrolle vor, welche durch Fäulnisveränderung der Proben und den Obduktionsprotokollen zu entnehmenden unklaren Todesursachen oder Versterben durch thermische Einflüsse (Hitze) sowie Schädel-Hirn-Traumata ebenfalls auf 44 bereinigt werden mussten. Das Durchschnittsalter dieses Kollektivs beträgt 59,2 Jahre und die Todesursachen sind sowohl natürlich als auch nicht natürlich.

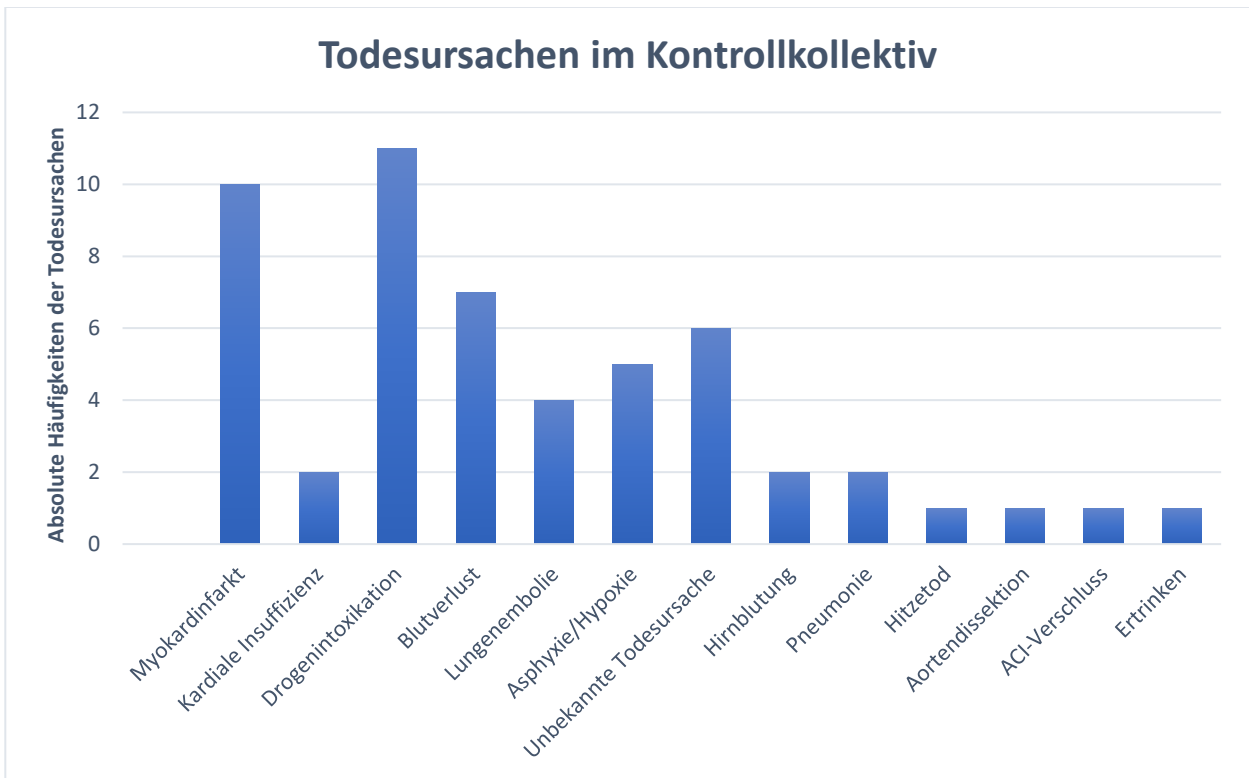
In der folgenden Tabelle wird das Kontrollkollektiv mit den Unterkühlungsfällen vergleichbaren Merkmalen Geschlecht, Alter, Auffindeort, Liegezeit, kardialer Vorbelastung und Rauschmittelintoxikation, aktuell oder in regelmäßigen Intervallen, aufgeführt, wobei der Todesmonat in diesen Fällen keine signifikante Rolle spielt und daher nicht erscheint. Die Todesursache wird hingegen als wichtiger Abgrenzfaktor zur Unterkühlung dargelegt.

**Tab. 2:** Zusammenstellung der Merkmale des Kontrollkollektivs dieser Arbeit (Geschlecht, Alter, Auffindeort, bekannte kardiale Belastung, Intoxikation mit Alkohol oder Drogen, Liegezeit, Todesursache)

	Geschlecht	Alter	Auffindeort	Kardiale Belastung	Intoxikation	Liegezeit	Todesursache
1	m	59	draußen vor der Weide	positiv	-	Stunden	Herzinfarkt
2	m	100	Krankenhaus	-	-	< 1 Stunde	Ausgedehnte entz. Veränderung v.a. Darm & Lunge
3	w	66	zu Hause	-	positiv	1,5 Tage	Stroke + Pneumonie
4	w	71	Krankenhaus	-	positiv	< 1 Stunde	Tablettenintoxikation, akute hämorrhagische Pankreatitis
5	w	85	bei OP verstorben (KH)	-	-	< 1 Stunde	Lungenembolien

	Geschlecht	Alter	Auffindeort	Kardiale Belastung	Intoxikation	Liegezeit	Todesursache
6	m	69	draußen	-	positiv	max. 1 Tag	Inneres Verbluten nach Polytrauma; Zerreißung des rechten Leberlappens
7	w	72	zu Hause	-	-	2 Tage	Burking
8	m	34	Wohnung	-	positiv	8 Stunden	Bolustod
9	m	22	zu Hause	-	positiv	wenige Stunden	Drogenintoxikation
10	m	30	Straße	-	positiv	< 1 Stunde	Drogenintoxikation
11	w	34	zu Hause	-	positiv	Stunden	Intoxikation (a.e. Alkohol)
12	w	67	Krankenhaus	-	-	< 1 Stunde	Herzbeutelamponade bei Aortendissektion
13	w	40	zu Hause	-	positiv	max. 1 Tag	Zerebraler Krampfanfall bei Intoxikation
14	w	68	Krankenhaus	-	-	< 1 Stunde	Blutverlust & Lungenembolie
15	w	64	im Auto im Teich	-	-	max. 5 Stunden	Ertrinken
16	w	80	Krankenhaus	positiv	-	< 1 Stunde	Herzinfarkt
17	w	75	zu Hause	-	-	Stunden	Erdrosseln
18	m	88	Krankenhaus	positiv	-	< 1 Stunde	Herzinsuffizienz mit Lungenödem & Pleuraerguss bei stark vorgeschädigtem Herz
19	w	49	Parkplatz	-	-	Stunden	Ventrikelblutung bei SAB
20	m	42	Wohnung	-	positiv	Stunden	Drogenintoxikation (Heroin + Alkohol)
21	m	69	zu Hause	-	positiv	max. 2 Stunden	äußeres Verbluten nach suizidalem Eröffnen von Halsgefen & Einstich in li. Leberlappens
22	m	47	Straße	-	positiv	Stunden	Drogenintoxikation (Heroin)
23	w	82	Pflegeheim	positiv	-	Stunden	Herzinfarkt
24	m	47	zu Hause	-	positiv	Stunden	Fulminante Lungenembolie
25	m	74	Krankenhaus	positiv	-	< 1 Stunde	Herzinfarkt
26	m	38	zu Hause	-	positiv	< 1 Stunde	Drogenintoxikation
27	m	95	in Altenpflegeheim	positiv	-	Stunden	Herzinfarkt bei starker Koronarsklerose
28	w	80	zu Hause	positiv	-	Stunden	Herzinfarkt
29	w	7	Kinderklinik	-	-	< 1 Stunde	Strangulation mit Gurt einer Sitzschale

	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auffindeort</b>	<b>Kardiale Belastung</b>	<b>Intoxikation</b>	<b>Liegezeit</b>	<b>Todesursache</b>
30	w	69	zu Hause	-	-	max. 2 Stunden	Fulminante Lungenembolie bei TVT d. Unterschenkels
31	m	44	zu Hause	positiv	positiv	Stunden	Herzinfarkt
32	w	87	Krankenhaus	-	-	< 1 Stunde	Blutverlust nach elektiver OP
33	w	84	Krankenhaus	positiv	-	< 1 Stunde	Akute Herzinsuffizienz bei Ileus + Sepsis
34	m	30	zu Hause	-	positiv	max. 5 Tage	Drogenintoxikation
35	m	44	zu Hause, anschließend erfolglose Reanimation bis Krankenhaus	positiv	-	wenige Stunden	Herzinfarkt
36	m	51	Krankenhaus	-	-	< 1 Stunde	a.e. hämorrhagischer Schock
37	m	31	Wohnung	-	positiv	max. 2 Tage	Drogenintoxikation (Heroin)
38	m	73	Krankenhaus	-	-	< 1 Stunde	Verbluten bei Gerinnungsstörung nach OP
39	m	76	Krankenhaus	positiv	-	< 1 Stunde	Herzinfarkt
40	w	63	PKW	-	-	max. 12 Stunden	Thrombotischer Verschluss der ACI links
41	w	46	Wohnung	-	positiv	Stunden	Inneres Verbluten bei Ösophagusulzeration
42	w	76	Krankenhaus	-	-	< 1 Stunde	Hypoxischer Hirnschaden nach Fehlintubation
43	m	51	zu Hause	positiv	-	wenige Stunden	Herzbeutelamponade, akuter Myokardinfarkt
44	m	25	draußen	-	positiv	max. 6 Stunden	BTM-Intoxikation



**Abb. 2:** Säulendiagramm-Darstellung der Todesursachen in der Kontrollgruppe (44 Fälle) auf der X-Achse entnommen aus Obduktionsbefunden sowie deren Häufigkeit in absoluten Zahlen auf der Y-Achse (Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn)

### 2.3 Entnahme und Aufbereitung des Schnittmaterials

Aufgrund der retrospektiven Entnahme der Proben aus dem asservierten Material ließ sich kein einheitliches Entnahmesystem der Organfragmente gewährleisten. Es wurde allerdings beachtet, alle Gehirnschnitte samt Cortex und Medulla und alle Leberschnitte samt Kapsel zu entnehmen, sodass zumindest die histologische Architektur der Organe untereinander ähnlich war.

Die Fixierung und Entwässerung der Organe nach der Entnahme erfolgten durch neutrales Phosphat-gepuffertes Formaldehyd. Nach Zurechtschneiden der zu färbenden Fragmente, welche je nach Organgröße im Histologie-Behälter unterschiedliche Flächen aufwiesen, wurden diese in Kassetten mit den Ausmaßen 3,3cm x 2,7cm gelegt und in Paraffin gebettet.

Das geschah zunächst durch Wässerung des Organs, um das im Organ befindliche Formaldehyd durch Wasser zu ersetzen, welches im nächsten Arbeitsschritt langsam



durch Ethanol in aufsteigender Konzentration, dann durch Xylol und schließlich durch das Einbettmittel Paraffin ersetzt wurde. Dieser Schritt geschah in einem Zeitraum von 20,5 Stunden ausgeführt durch einen Einbettautomat, sogenannte Autotechnicon (SHANDON, Cindel 1000), welcher, nach bestimmten Zeiten programmiert, den Standort der Proben in den Bädern der Reihe nach wechselt. (Einbettprotokoll siehe unten)

Im Anschluss wurden die Proben in Paraffin ausgegossen und diese Paraffinblöcke mit dem Mikrotom bearbeitet, die Schnitte auf Objektträger überführt und bei 37°C mindestens 24 Stunden inkubiert.

#### Einbettprotokoll des Autotechnicon:

Paraffinbäder durch Thermostate und elektrische Heizung auf 60°C erhitzt;  
Gesamtdauer 20,5 Std.

1. 70 % Ethanol	1,5 Stunden
2. 70 % Ethanol	1,5 Stunden
3. 96 % Ethanol	1,5 Stunden
4. 96 % Ethanol	2 Stunden
5. 100 % Ethanol	1,5 Stunden
6. 100 % Ethanol	1,5 Stunden
7. 100 % Ethanol	1,5 Stunden
8. Xylol	1 Stunde
9. Xylol	1,5 Stunden
10. Xylol	1,5 Stunden
11. Paraplast	2 Stunden
12. Paraplast	3,5 Stunden

#### 2.4 Konventionelle und Immunhistochemische Färbemethoden

Im Rahmen dieser Dissertation wurden sämtliche Proben der zu untersuchenden Kollektive konventionell und immunhistochemisch gefärbt. Die Färbung erfolgte im

histologischen Labor des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn mit Hilfe von bereits etablierten Färbeprotokollen (siehe 2.5).

Zur Übersicht über die Organe und deren Beschaffenheit wurde eine konventionelle HE-Färbung angefertigt und zur Bestimmung des Vorkommens von HSP 27, 60 und 70 in den Präparaten eine immunhistochemische Färbung mittels der Avidin-Biotin-Methode durchgeführt.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE): Übersichtsfärbung. Saure bzw. basophile Elemente werden durch das Hämatoxylin blau angefärbt (z.B. Zellkerne & DNA), basische bzw. acidophile Elemente durch das Eosin rot (z.B. Proteine des Zytoplasmas, Kollagen, Mitochondrien).

HSP 27: Ein ATP-unabhängig arbeitendes Chaperon, welches in nahezu allen Zellen vorzufinden ist. Vornehmlich ist es im Zytosol der Zellen lokalisiert, aber auch im Nucleus, im perinukleären Raum und im Endoplasmatischen Retikulum (Garrido, 2002; Parsell et al., 1993). Antikörper: Monoklonales Maus Anti Human HSP 27, Novocastra, Leica Biosystems, Code: NCL-HSP27

HSP 60: Chaperon, das zytosolisch oder mitochondrial vorliegen kann. Bei Bedarf kann eine Umlagerung zwischen den Lokalisationen erfolgen (Parcellier et al., 2003; Vargas-Parada et al., 2001b). Antikörper: Monoklonales Maus Anti Human HSP 60, SIGMA-ALDRICH, Code: H4149

HSP 70: Ein ATP-gebundenes Chaperon mit ATPase-Aktivität, welches bei Eukaryoten in Zytosol, Mitochondrium und Lumen des Endoplasmatischen Retikulums vorliegt (Garrido et al., 2006; Schlesinger, 1990). Antikörper: Monoklonales Maus Anti Human HSP 70, Novocastra, Leica Biosystems, Code: NCL-HSP70

Eine detaillierte Ausführung der immunhistochemischen Färbung folgt im Abschnitt 3.5.

Die Bearbeitung der Proben mittels HE-Färbung erfolgte mittels eines bereits etablierten Färbeprotokolls.

### HE-Färbung:

1. 20 Minuten in Xylol entparaffinieren
2. Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe: 2x100 %iger, 2x96 %iger, 2x70 %iger und 1x50 %iges Propanol; je 10 Sekunden schwenken
3. In Aqua demineralisata waschen (10 Sekunden schwenken)
4. 10 Minuten Anfärben in Hämatoxylin (Färben des Chromatins)
5. 5 Minuten in warmem Leitungswasser waschen, sog. Bläuen, damit nur die Zellkerne angefärbt bleiben
6. In Aqua demineralisata waschen
7. 20 Sekunden in Eosin färben (Färben des Zytoplasmas)
8. In Aqua demineralisata waschen
9. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe: 2x70 %iger, 2x96 %iger und 3x100 %iger Propanol; je 10 Sekunden schwenken
10. Klären in Xylol 1 Minute
11. Eindecken mit xylohaltigem Klebematerial

Die Alkoholreihe, das Aqua demineralisata und die Färbemittel wurden vor jedem Färbeansatz neu aufgefüllt.

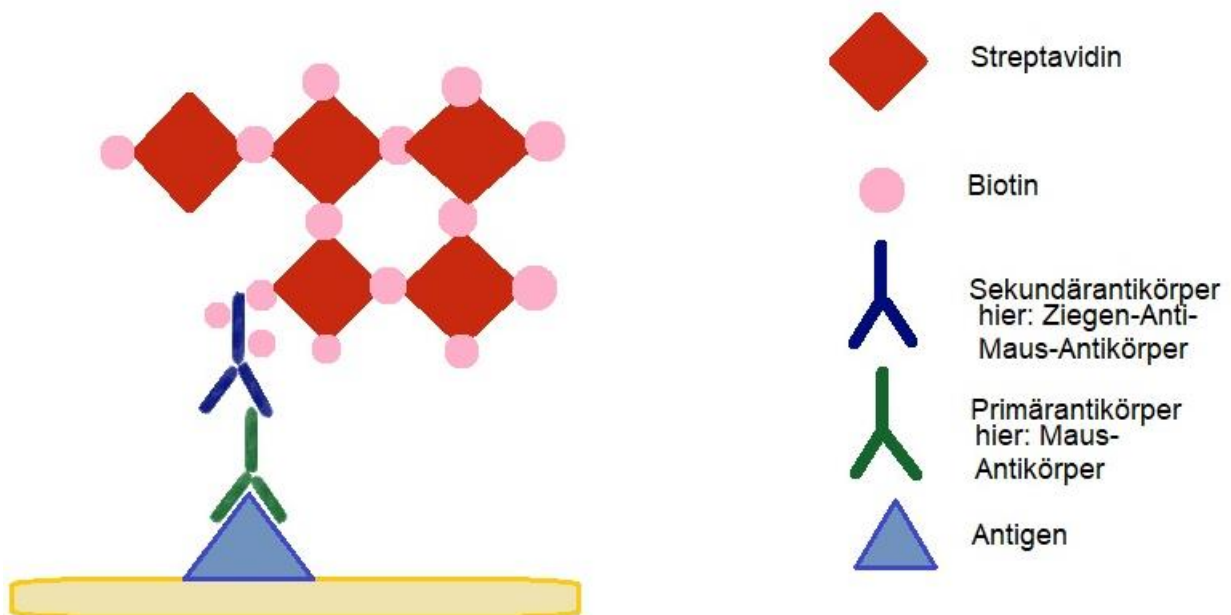
## 2.5 Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) und Färbeprotokoll

### 2.5.1 Prinzip

Bei der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) wird sich die hohe Bindungsaffinität zwischen dem Eiweiß-Glykoprotein Avidin und Biotin, also Vitamin H, zu Nutze gemacht. In der Immunhistochemie wird Streptavidin, welches aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert werden kann, verwendet, da es im Gegensatz zum Eiweiß-Avidin keine Glykosylierung, somit weniger unspezifische Bindungen aufweist und so spezifischer eingesetzt werden kann.

Zunächst wird ein Primärantikörper, in dieser Arbeit ein monoklonaler Maus-Antikörper, welches sich spezifisch an das zu markierende Antigen anlagert, zugeführt. Nach Gewährleistung der Bindung erfolgt die Zugabe eines Sekundärantikörpers, welcher

wiederum spezifisch an den Fab-Abschnitt der Primärantikörper bindet. In dieser Arbeit wurden Ziegen-Anti-Maus-Antikörper verwendet. Die zugegebenen Sekundärantikörper sind mit Biotin und einem Avidin-Biotin-Komplex markiert, sodass sich auf ein Antigen-Epitop größere Avidin-Biotin-Antikörper-Komplexe ausbilden können. Das kann genutzt werden, um eine geringe Quantität an Antigenen durch einen großen anfärbbaren Komplex zu verbildlichen. Hierfür wird zuletzt das AEC-Substrat (3-Amino-9-ethylcarbazol) hinzugefügt, welches mit Wasserstoffperoxid zu einem roten, wasserunlöslichen Farbstoff oxidiert (Glass et al., 2009; Hsu und Raine, 1981).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des Prinzips der Avidin-Biotin-Komplex-Methode

### 2.5.2 Durchführung und Färbeprotokoll

Die zentrale Fragestellung dieser Dissertation war, ob sich im von Hypothermie beeinflussten Gewebe vermehrt Heat Shock Proteine nachweisen lassen im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen mit vielfältigen Todesursachen. Dafür erwies sich die Avidin-Biotin-Methode zur immunhistochemischen Anfärbung dieser Proteine als das Verfahren der Wahl.

Die Färbung erfolgte für alle anfangs ermittelten Unterkühlungsfälle, da der Grad der Fäulnis und so die Aussagekraft dieser Färbung sich lediglich mikroskopisch sicher darstellen ließ. Im Anschluss erfolgte eine Selektion der Proben nach sichtbaren Fäulnisprozessen, also autolytischen Veränderungen, und fäulnisfreien Fällen. Zusätzlich wurde zu jedem Färbansatz sowohl beim Unterkühlungs-, als auch beim Kontroll-Kollektiv eine positive Kontrolle mitgefärbt, um ein Gelingen des Verfahrens verifizieren zu können.

#### Angewandtes Färbeprotokoll der ABC-Methode:

1. Entparaffinierung durch Xylolbad, 20 Minuten
2. Rehydrierung durch absteigende Alkoholreihe: Ethanol, jeweils 10 Minuten
3. 1 Minute Waschen in TRIS-Puffer zur Herabsetzung der Oberflächenspannung der Flüssigkeiten auf dem Objektträger und so Spreitung der Antikörper möglich
4. Kochen in Citratpuffer pH=6 bei 30 Minuten in der Mikrowelle (800 Watt) zur Demaskierung der Epitope; stellt ursprüngliche durch Formalinfixierung veränderte Tertiärstruktur wieder her (zwischendurch Auffüllen des langsam verdampfenden Citratpuffers)
5. Abkühlen 10 Minuten im kalten Wasserbad
6. 1 Minute Waschen in TRIS-Puffer
7. Je 4 Tropfen Schweine-Serum auf jedes Präparat und 20 Minuten Inkubation in feuchten abgedeckten Inkubationsboxen zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen
8. 2 Tropfen Primärantikörper (Monoklonaler Maus Anti Human Hsp Antikörper) auf jedes Präparat und Inkubation bei 4-8°C etwa 6-12 Stunden zur Bindung ans Ziel-Epitop
9. 1 Minute Waschen in TRIS-Puffer
10. Je zwei Tropfen Sekundär-Antikörper (Biotinmarkierter Ziegen Anti Maus & Anti Kaninchen Antikörper) auf jedes Präparat und bei Raumtemperatur 30 Minuten Inkubation in feuchter Inkubationsbox
11. 1 Minute Waschen in TRIS-Puffer

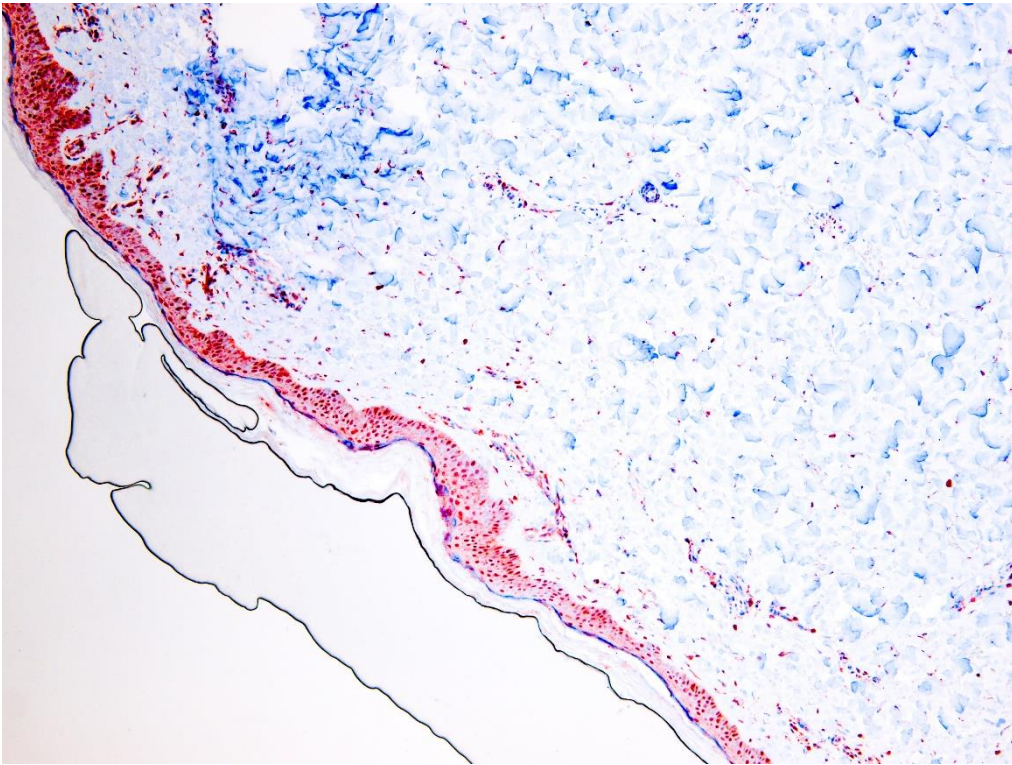
12. Beträufeln aller Objektträger mit Peroxidase-Blocking-Solution (Peroxid) und bei Raumtemperatur 5 Minuten Inkubation in feuchter Inkubationsbox, verhindert durch endogene Peroxidase falsch positive Reaktionen
13. Je 1 Minute Waschen in 2 TRIS-Puffer-Bädern
14. Je 2 Tropfen Streptavidin-gebundene Meerrettichperoxidase auf jedes Präparat und bei Raumtemperatur 30 Minuten Inkubation in feuchter Inkubationsbox, Avidin und Biotin binden
15. 1 Minute Waschen in TRIS-Puffer
16. Je 5 Tropfen AEC-Substrat auf jedes Präparat und bei Raumtemperatur in feuchter Inkubationsbox inkubieren, farbloses Chromogen wird durch Meerrettichperoxidase in roten Farbkomplex oxidiert
17. Lichtmikroskopische Kontrolle der Reaktionen, je nach Art des HSP unterschiedlich schnelle Reaktion
18. Bei starker sichtbarer positiver Reaktion (rot angefärbte Strukturen im Präparat) Abbruch der Reaktion durch Waschen in Aqua demineralisata
19. 15 Sekunden in Hämalaun (basisches Hämatoxylin) zur Kontrastfärbung des Hintergrundes
20. 5 Minuten in kaltem Leitungswasser bläuen
21. Eindecken mit Aquatex

Sämtliche Reagenzien wurden bei 4°C kühl gelagert und wurden kurz vor ihrer Verwendung aus der Kühlung entnommen, um die Reaktivität der Enzyme nicht zu verändern. Der HSP 60-Primärantikörper wurde in Tubes von 5µl Inhalt eingefroren gelagert und vor jedem Gebrauch frisch nach Mengenbedarf aufgetaut und mit Antibody-Diluent verdünnt.

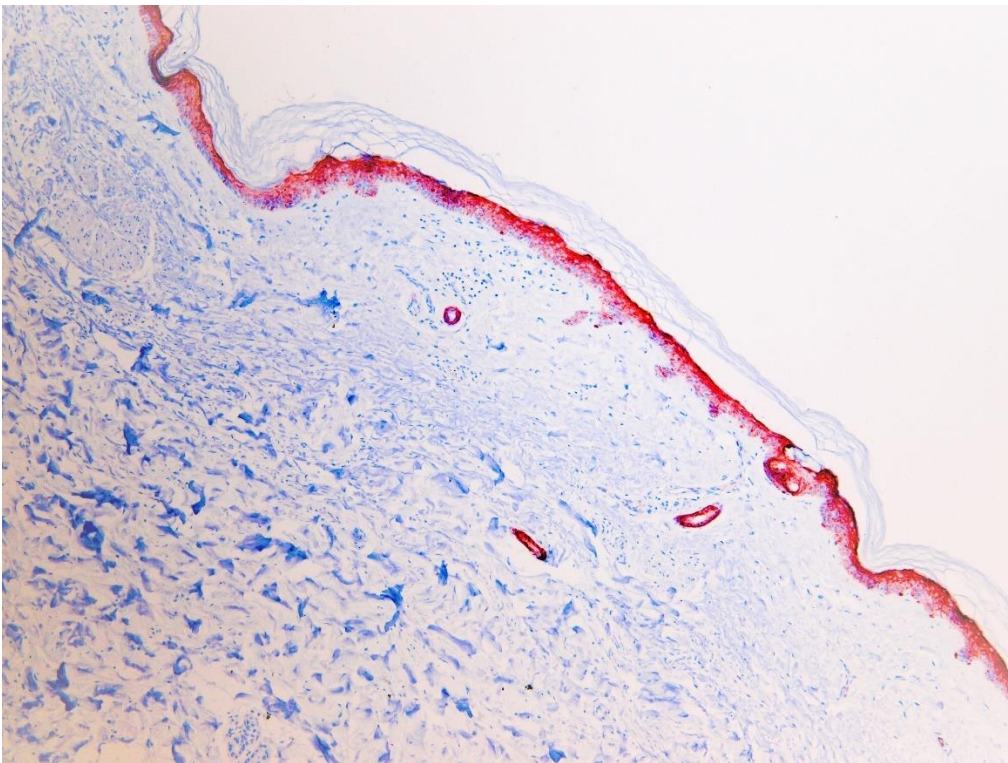
Das TRIS-Puffer-Bad wurde nach jedem Schritt erneuert, um keine Rückstände des vorangegangenen Präparates zu beinhalten.

Die Positiv-Kontrolle lief bei jedem Ansatz mit und zeigte immer eine positive Reaktion, sodass keiner der Färbeansätze aufgrund von Misslingen der Färbung wiederholt werden musste (Abbildungen 4-6).

Eine Auflistung der Reagenzien ist im Anhang zu finden.

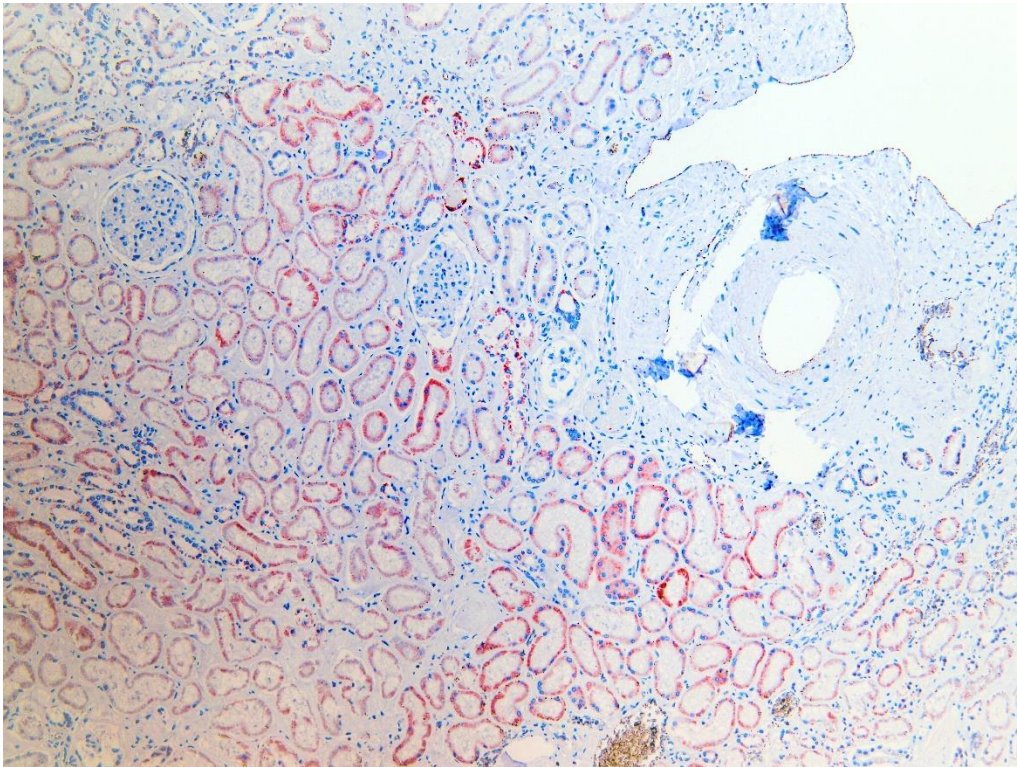


**Abb. 4:** Epidermis; Positiv-Kontrolle der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von HSP 70; Lichtmikroskop 100fache Vergrößerung



**Abb. 5:** Epidermis; Positiv-Kontrolle der Immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von HSP 27; Lichtmikroskop 100fache Vergrößerung





**Abb. 6:** Niere; Positiv-Kontrolle der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von HSP 60; Lichtmikroskop 100fache Vergrößerung

## 2.6. Auswertung

### 2.6.1 HE-Färbung

Jedes Organ wurde neben der immunhistochemischen Aufbereitung zudem HE gefärbt. Diese Darstellung diente als Übersichtsfärbung zur Detektion von autolytischem Gewebe und damit zum Ausschluss von Fällen, bei denen fäulnisbedingt keine Beurteilung der histologischen Strukturen möglich war. Eine prolongierte Liegezeit geht mit Fäulnisveränderungen einher, sodass bei Ausbleiben des Färbeerfolges unklar bleibt, ob die Ursache bei dem autolytischen Abbau oder einem Fehler im Färbeprozess selbst liegt. Resultierend aus den Untersuchungen der HE-gefärbten Präparate mussten aufgrund von Autolyse weitere Fälle aus der Studie ausgeschlossen werden, welche nach Studie der Obduktionsunterlagen im Kollektiv verblieben wären. Grobe Pathologien, welche die Beurteilbarkeit der Organe bzw. des Vorliegens von HSP eingeschränkt hätten, z.B.

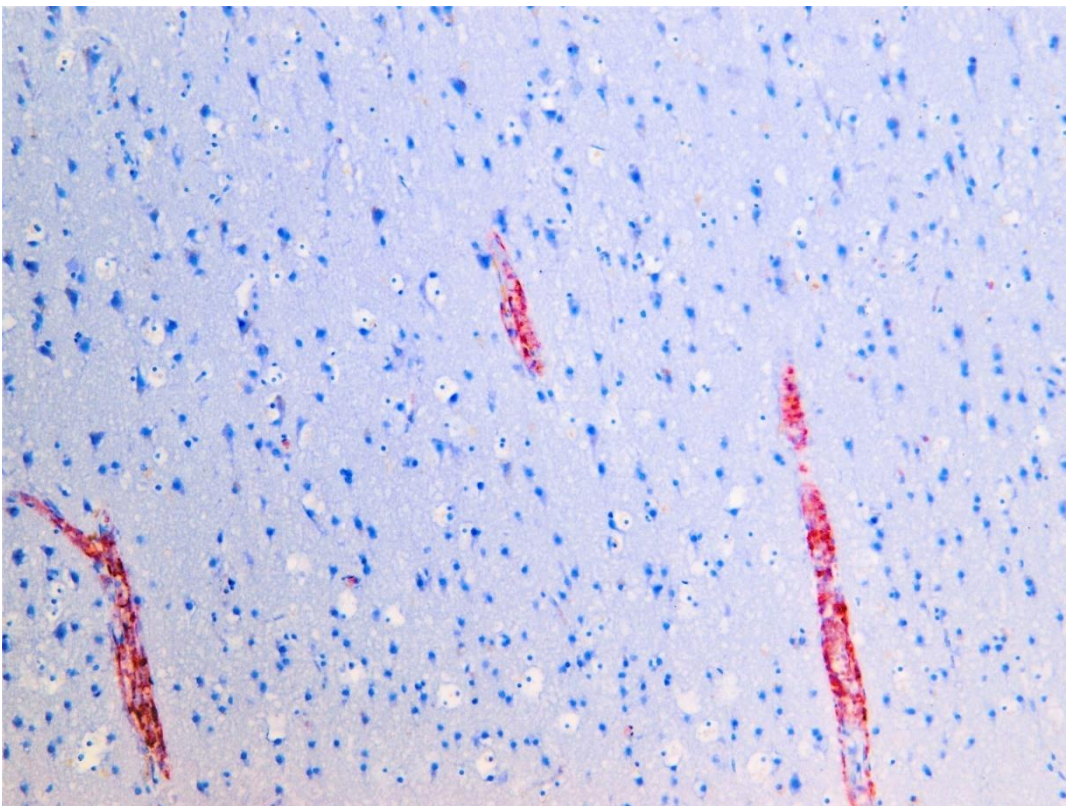
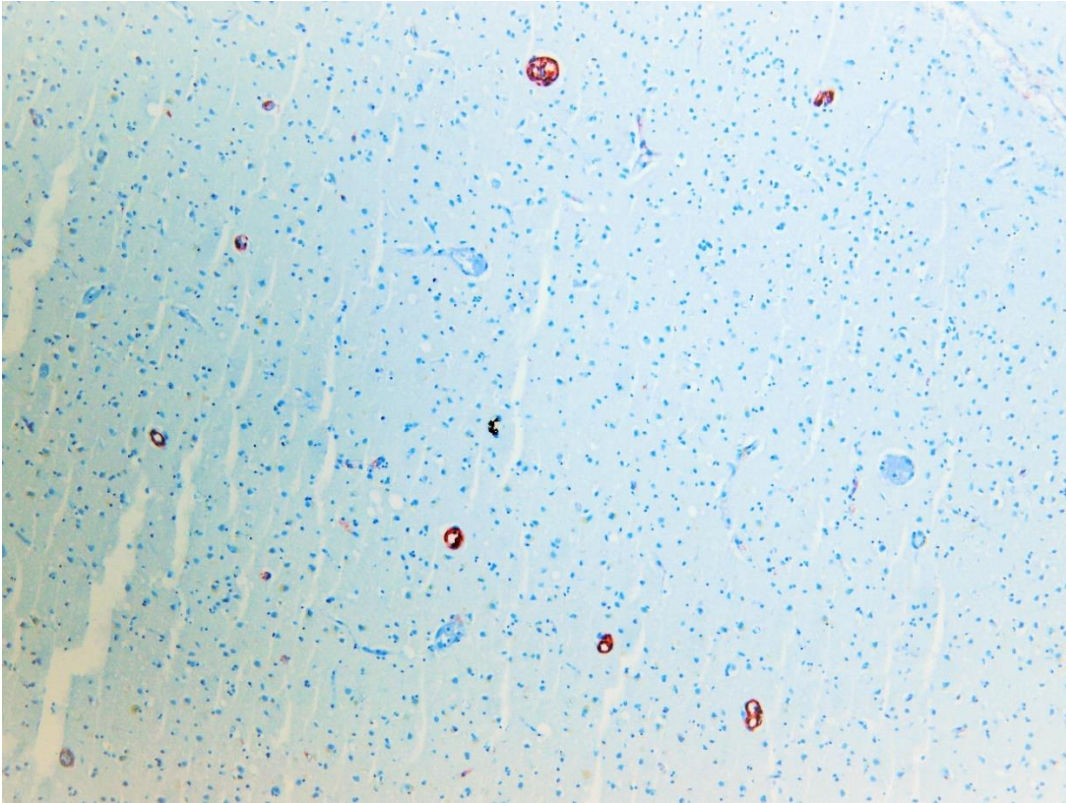


Karzinome oder andere Gewebeveränderungen, fanden sich in keinem der untersuchten Organe.

### 2.6.2 Immunhistochemie

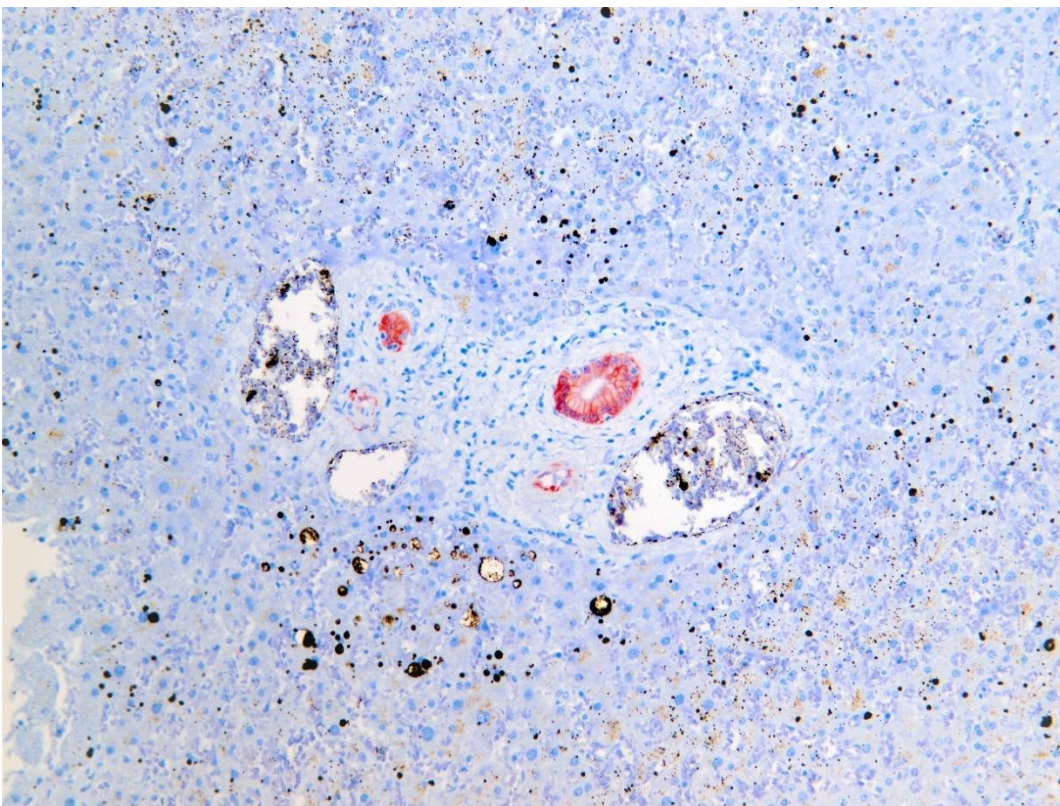
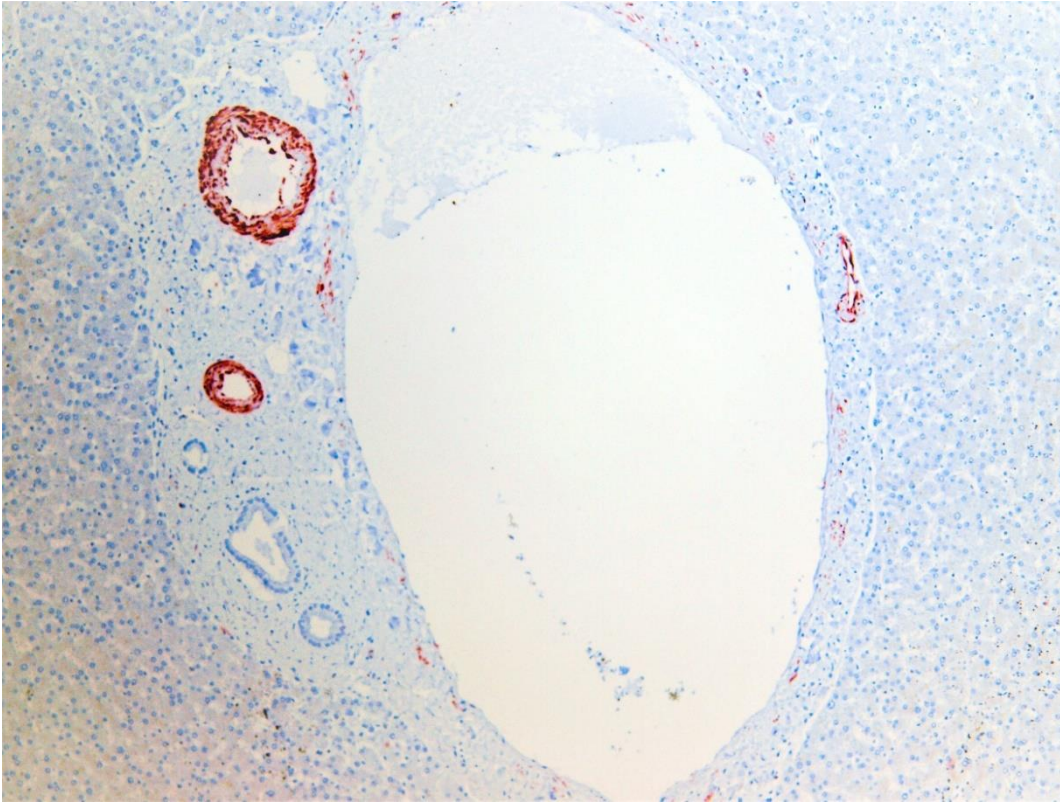
Die immunhistochemische Färbung diente zur visuellen Darstellung von HSP in den untersuchten Präparaten. Hierbei werden die spezifische Bindung von Antikörpern und eine chemische Färbereaktion genutzt (siehe 2.5.1). Dabei lässt sich dort, wo roter Farbstoff lichtmikroskopisch sichtbar ist, der eindeutige Nachweis von HSP erbringen, da die Antikörper an ein für sie spezifisches Antigen nach Schlüssel-Schloss-Prinzip binden. Diese roten Färbungen fanden sich in den untersuchten Präparaten beider Kollektive in bestimmten Zellen oder Gewebeformationen, sodass Rückschlüsse auf den genauen Bildungsort gezogen werden konnten. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Betrachtung der Verteilung und der Menge an positiver Färbung bei unterschiedlicher Vergrößerung und eine Errechnung des Anteils am Gesamtpräparat. Hierauf wird im Folgenden genauer eingegangen.

Da sich in allen Organschnitten vereinzelte fleckförmige Positiv-Reaktionen über das gesamte Präparat verteilt, im Folgenden Hot-Spots genannt, fanden, dazwischen aber auch große Regionen ohne positive Färbereaktion lagen, war eine Auszählung einer bestimmten Anzahl von genormten Gesichtsfeldern als Repräsentator des gesamten Präparates nicht möglich. Die Leberschnitte wiesen die positiven Reaktionen sowohl bei Färbung von HSP 27 als auch bei HSP 60 immer in den Periportalfeldern, entweder in der Media der Arterien oder dem Epithel der Gallengänge auf (Abbildungen 9, 10, 13 & 14). Im Gehirn waren ebenfalls in allen Fällen die Wandschichten der Arterien, Arteriolen oder Kapillaren gefärbt (Abbildungen 7, 8, 11 & 12), hier auch in größeren Hot Spots über das Organ verteilt gelegen, sowohl in Mark- als auch in Rindengebieten. Hierbei wäre der Informationsverlust durch das Anlegen von Gesichtsfeldern zu ausgedehnt gewesen, da diese immer über die gleichen Stellen der Proben gelegt werden müssen, die Hot-Spots sich aber in vollständig unterschiedlichen Feldern befanden. Hierdurch hätte es einerseits falsch positive oder auch falsch negative Ergebnisse durch Extrapolieren der Zählungen gegeben.



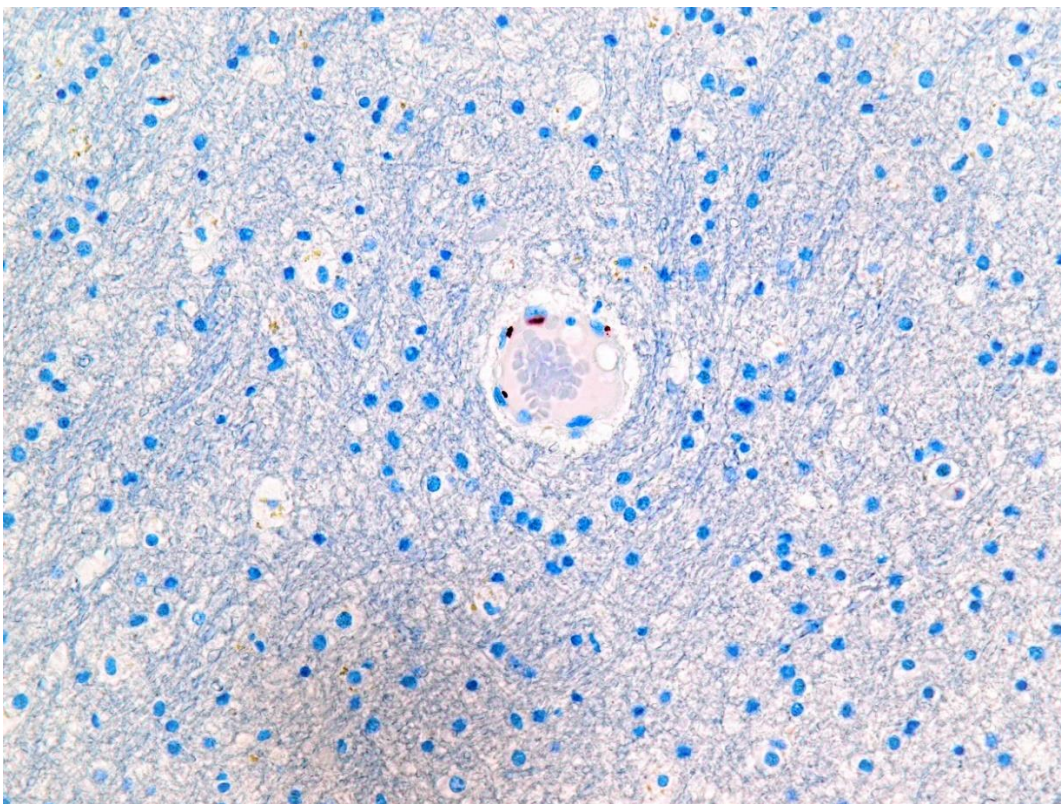
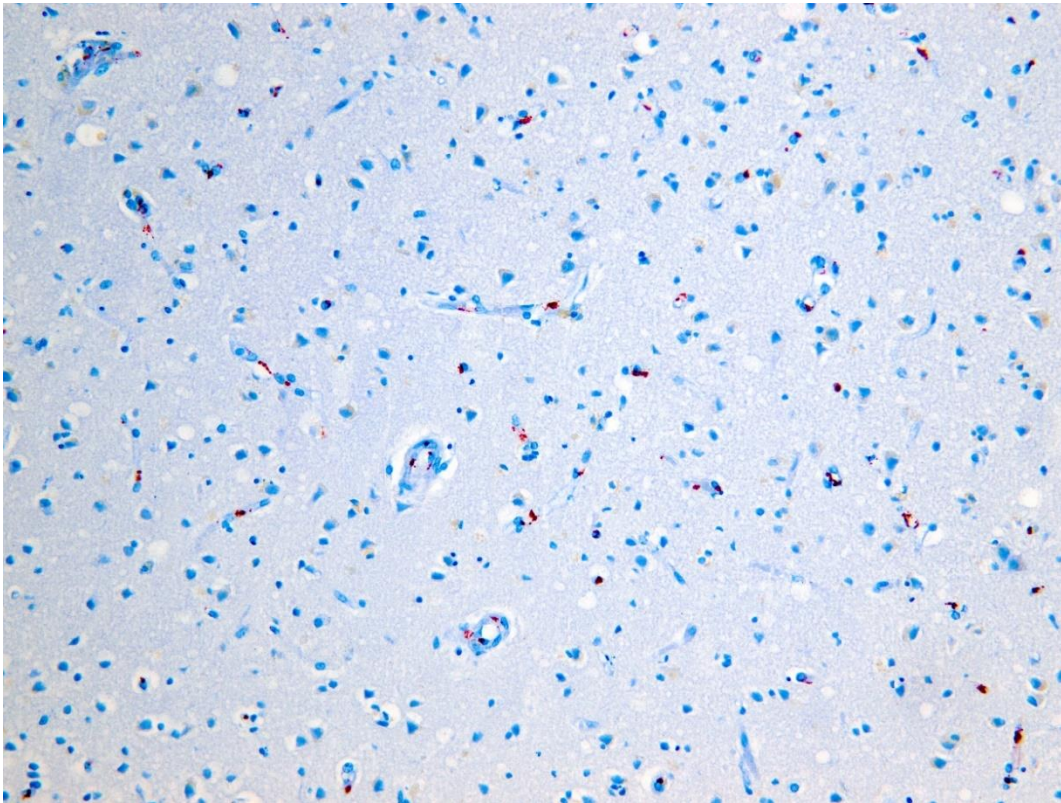
**Abb. 7 und 8:** Gehirn; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 27; Lichtmikroskop 100fache (oben) und 200fache (unten) Vergrößerung





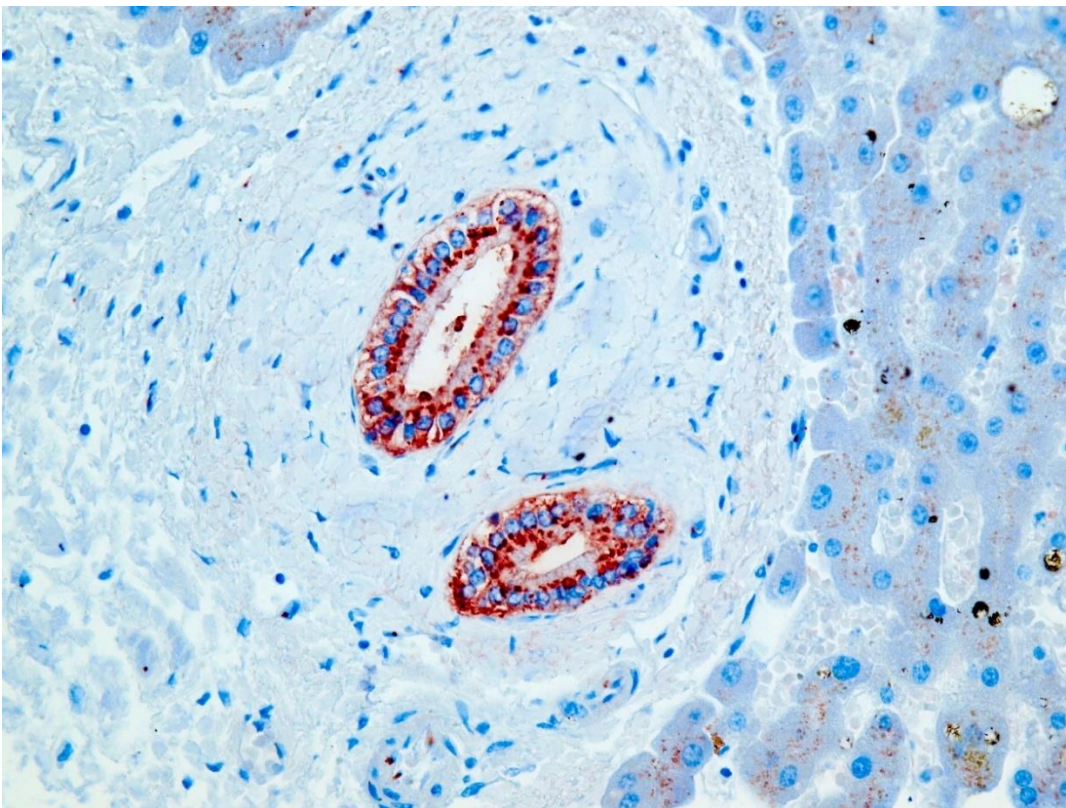
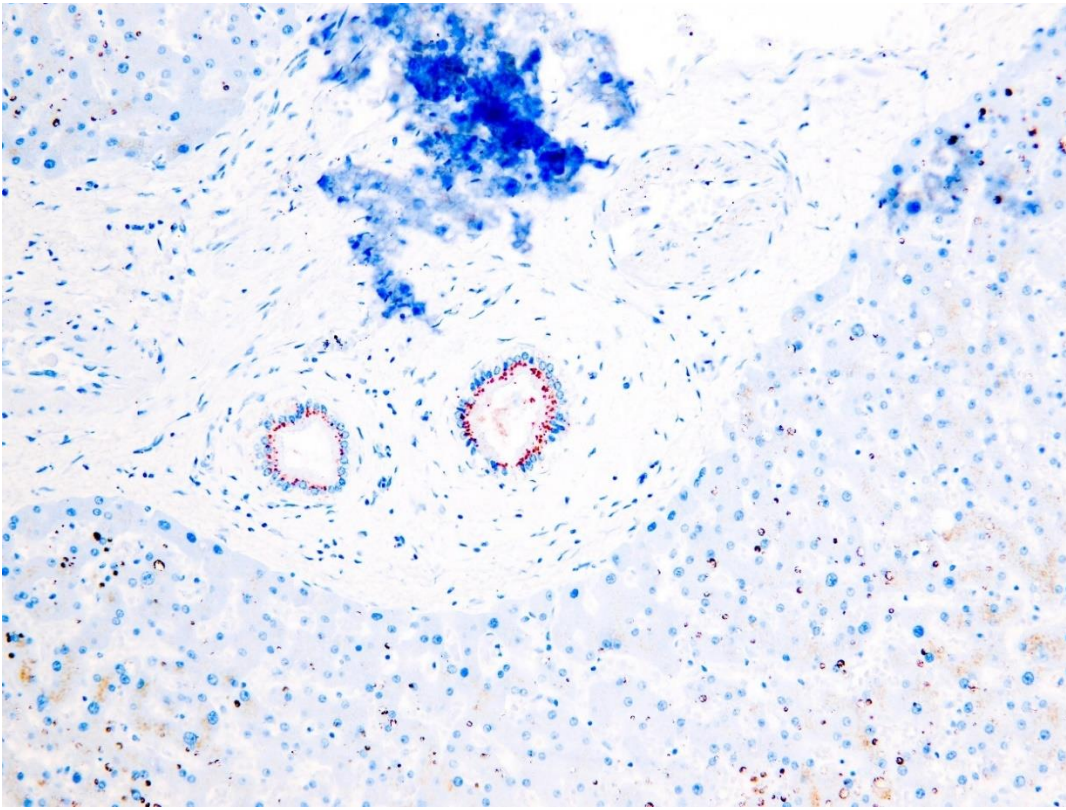
**Abb. 9 und 10:** Leber; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 27; Lichtmikroskop 100fache (oben) und 200fache (unten) Vergrößerung





**Abb. 11 und 12:** Gehirn; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 60; Lichtmikroskop 200fache (oben) und 400fache (unten) Vergrößerung





**Abb. 13 und 14:** Leber; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 60; Lichtmikroskop 200fache (oben) und 400fache (unten) Vergrößerung

Daher wurde eine andere Methode zur Erfassung der positiv gefärbten Anteile gewählt. Angelehnt an Preuß et al. (2008) wurde die gesamte Größe des Präparates in 40facher Vergrößerung lichtmikroskopisch in eine bestimmte Anzahl an Feldern eingeteilt. Anschließend wurden die rot gefärbten Hot Spots in der 100fachen Vergrößerung gezählt – beispielsweise waren über ein Organpräparat mit der Größe von 12 Feldern 40facher Vergrößerung 3 Hot Spots verteilt, welche jeweils 8, 17 und 18 Gesichtsfelder in 100facher Vergrößerung fassten. Da ein einzelnes Feld mit der 40fachen Vergrößerung 4 Felder mit der 100fachen Vergrößerung beinhaltet, ließ sich schließlich ein relativer Anteil des rot gefärbten Gewebeanteils am Gesamtpräparat errechnen. In diesem Beispiel waren 89,58 Prozent des Präparates positiv gefärbt, da insgesamt 43 (8+17+18) Gesichtsfelder in 100facher Vergrößerung mit HSP-Nachweis vorlagen. Ein Präparat, welches aus 12 40fach vergrößerten Feldern besteht, fasst somit auch 48 100fach vergrößerte Felder. Damit ergibt sich ein Anteil von 43/48 positiven Feldern, also von relativ gesehen 89,58 Prozent. Die Intensität der roten Färbung, also die Helligkeit der Farbe in den jeweiligen Zellen spielte in dieser Untersuchung keine Rolle. Im Falle der HSP 60 untersuchten Organe gab es keine Unterschiede in der Farbintensität, bei der HSP 27 Färbung waren Abstufungen in der Helligkeit der roten Färbung zu sehen, diese können aber auch ein durch die Anfärbung selbst bedingtes Phänomen sein.

### 2.6.3 Graduierung

Nach Berechnung der prozentualen Anteile positiver Reaktionen, also nachweisbaren HSP über das gesamte Präparat, erfolgte eine statistische Auswertung. Zunächst wurde eruiert, ob generell eine positive oder eine negative Anfärbung vorlag. Anschließend erfolgte eine Graduierung der einzelnen Fälle in 6 Stufen, wobei Grad 0 einer fehlenden Färbung entspricht. Diese ist in der Tabelle 3 dargestellt und beruht auf den unterschiedlich frequentiert auftretenden HSP im Organ. Dafür wurden die relativen Zahlen jeweils in einzelne Gruppen von 20 %-Abständen, was jeweils einem Grad entspricht, zusammengefasst und erneut nach ihrer Häufigkeit aufgetragen (Tabelle 3 sowie Abbildungen 20-27 und 30-36).

**Tab. 3:** Graduierung der immunhistochemisch positiv gefärbten Organschnitte. Einschätzung der roten Felder zum gesamten Präparat in Prozent.

Anteil positiv gefärbter Felder (%)	Grad
0	0
1-20	1
21-40	2
41-60	3
61-80	4
81-100	5

#### 2.6.4 Statistische Auswertung

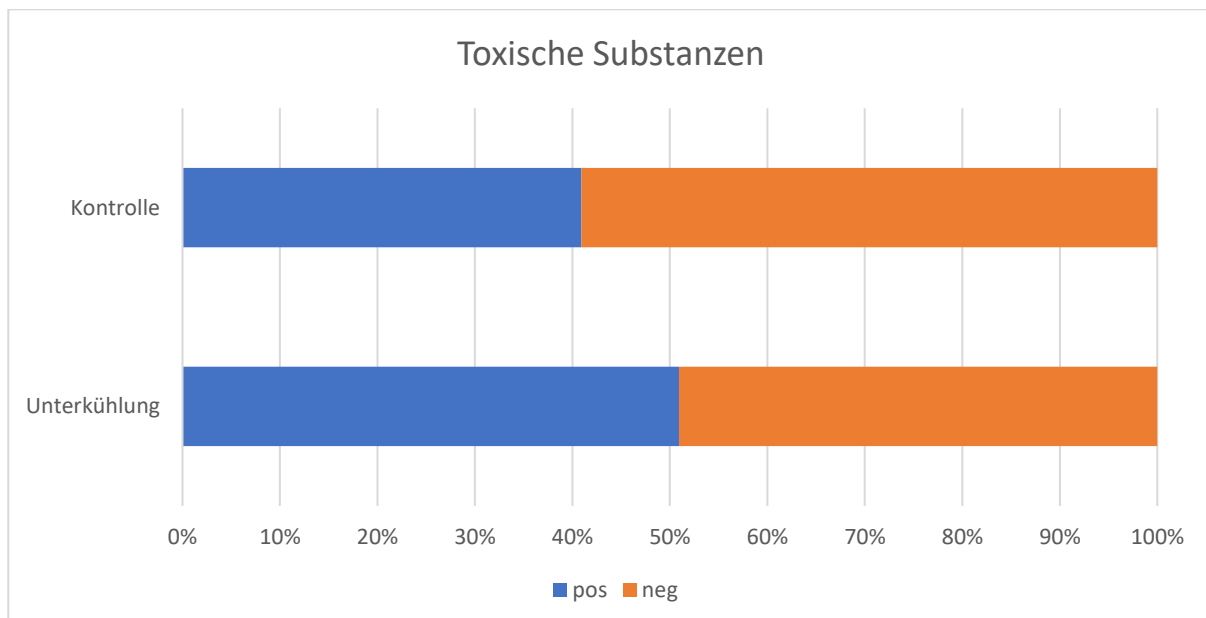
Die Auswertung und graphische Darstellung der mathematisch-statistischen Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5, die Darstellung der Balkendiagramme mittels Microsoft Excel.

Eine Auszählung wie bei Preuss et al. (2008) war aufgrund der ungleichen Verteilung der Hot Spots über die Präparate nicht vollständig adaptierbar (siehe 2.6.2), es wurde sich aber in dieser Arbeit daran orientiert. Die Errechnung der positiven gefärbten Anteile in einem Präparat erfolgte nicht als Hochrechnung, sondern es wurde vollständig betrachtet und der relative Anteil positiver Färbung am Gesamtpräparat errechnet. Zudem erfolgte eine Einteilung in Grade, sodass die einzelnen Fälle in Kategorien zusammengefasst wurden und damit zwischen Studien- und Kontrollgruppe vergleichbar waren. Die Methode der Graduierung orientierte sich grob an der Arbeit von Preuss et al. (2008), wobei hier nach Intensität der Färbung graduiert wurde. Da diese in der vorliegenden Arbeit eine untergeordnete Rolle spielte, erfolgte die Einteilung in Grade anhand des relativen Anteils der angefärbten Fläche am Gesamtpräparat (siehe 2.6.3). So lagen ordinalskalierte Daten vor, in welchen die Mediane der jeweiligen Fälle auf ihre Signifikanz miteinander verglichen wurden. Für die unabhängigen Stichproben wurde ein nicht-parametrischer Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney durchgeführt. Die errechnete zweiseitige asymptotische Signifikanz wird als p-Wert dargestellt, wobei das Signifikanzniveau auf 5% festgelegt wurde ( $p \leq 0,05$ ). Ob die Signifikanz auch klinische Relevanz zeigte, wird in der Diskussion genauer erörtert.

### 3. Ergebnisse

Sowohl die Hypothermie-, als auch die Kontrollgruppe boten mehrere ergänzende Faktoren, welche die Expression von HSP beeinflussen konnten. In dieser Arbeit lag der Fokus einerseits auf kardialer Vorschädigung, da dies nach Auszählung die häufigste Todesursache in der Kontrollgruppe darstellte. Zudem wurde der Einfluss von Alkohol oder anderen Toxinen berücksichtigt, insbesondere, da hier Leber und Gehirn untersucht wurden, welche durch langfristigen Ethanolkonsum beziehungsweise chronischem Zuführen anderweitiger toxischer Substanzen nachhaltig geschädigt werden. Außerdem lag das Augenmerk auf der Liegezeit bis zum Auffinden der Leiche, da einzelne Heat Shock Proteine ATP-abhängig ihre Funktionen entfalten, sodass möglicherweise dies bereits Einfluss auf die postmortale Nachweisbarkeit haben kann.

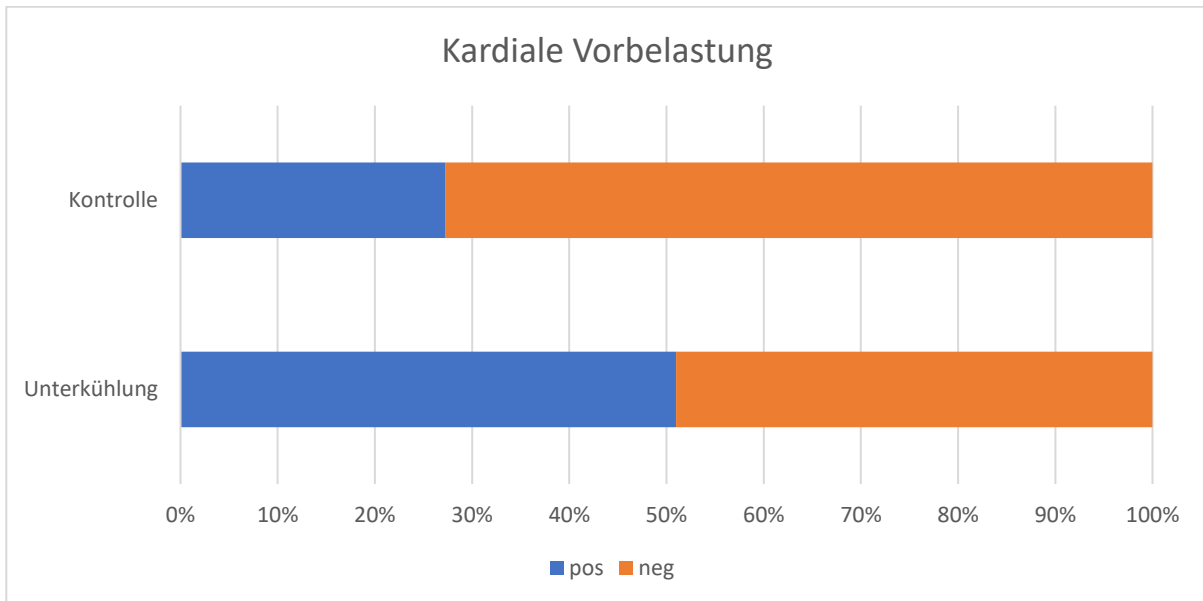
27 (50,9 %) Fälle im Studienkollektiv wiesen in der Auffindesituation eine bekannte Exposition zu Alkohol oder anderen Toxinen (Heroin, Kokain, Amphetamine oder Benzodiazepine) auf, in der Kontrollgruppe waren dies 18 (40,9 %) (Abbildung 15).



**Abb. 15:** Betrachtung des Vorliegens des potenziellen Einflussfaktors Alkohol- und/oder Drogenkonsum, anamnestisch oder toxikologisch nachgewiesen, im Vergleich zwischen Studienkollektiv (Unterkühlung) und der Kontrollgruppe (Kontrolle) in relativen Zahlen.



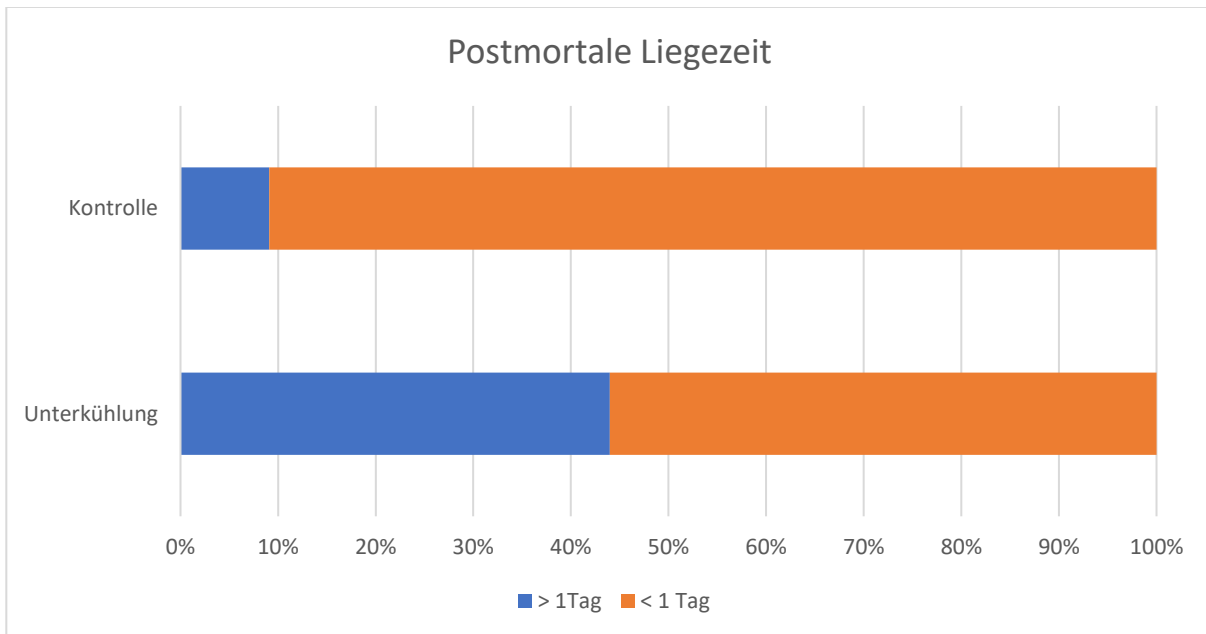
Vorbekannte kardiale Schädigung fand sich in der Unterkühlungsgruppe in 26 (50,9 %), in der Kontrolle in 12 (27,27 %) Fällen (Abbildung 16).



**Abb. 16:** Betrachtung des Vorliegens des potenziellen Einflussfaktors der kardialen Vorbelastung, anamnestisch oder anhand der Obduktionsbefunde nachgewiesen, im Vergleich zwischen Studienkollektiv (Unterkühlung) und der Kontrollgruppe (Kontrolle) in relativen Zahlen.

Die Liegezeit der Leiche konnte den Obduktionsprotokollen entnommen werden, sodass beide Kollektive in jeweils zwei Gruppen geteilt wurden. Einerseits die Gruppen mit einer Liegezeit von über einem Tag, was in der Studiengruppe 22mal (44,0 %) und in der Kontrollgruppe lediglich 4mal (9,1 %) vorkam. Eine Liegezeit von unter einem Tag wurde im Studienkollektiv 28mal (56,0 %) beschrieben, in der Kontrolle 40mal (90,9 %) (Abbildung 17). In drei Fällen im Studienkollektiv war eine Liegezeit nicht ermittelbar und wird daher nicht aufgeführt. Aufgrund der ungleichen Verteilung der Liegezeiten im Kontrollkollektiv erschien es im Gegensatz zum Unterkühlungskollektiv nicht sinnvoll, diese miteinander zu vergleichen. 16 der 40 Tode mit einer Liegezeit von weniger als einem Tag ereigneten sich im Krankenhaus (siehe Tabelle 2).

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Anschnitte als Übersichtsfärbung bot in keinem der Präparate nennenswerte Pathologien der histologischen Strukturen von Leber und Gehirn.



**Abb. 17:** Vergleich der postmortalen Liegezeiten zwischen Studienkollektiv (Unterkühlung) und Kontrollgruppe (Kontrolle) nach Einteilung der Zeiten in Intervalle > 1 Tag und < 1 Tag in relativen Zahlen.

### 3.1 Expression von HSP 70

Es färbte sich keine der untersuchten Proben von Kontroll- oder Studienkollektiv an, sodass der Nachweis von HSP 70 nicht gelang. Die in jedem Färbeprozess mit angefertigte Positiv-Kontrolle fiel stets positiv aus (Abbildung 4).

### 3.2 Expression von HSP 27

#### 3.2.1 Studienkollektiv Leber

In 17 (32,1 %) untersuchten Leberpräparaten kam es zu keiner positiven Reaktion zwischen HSP 27 und dem Antikörper, 36 (67,9 %) färbten sich positiv in variabler Quantität (Abbildungen 18, 20). Die Verteilung der rot gefärbten Zellen, also mit HSP Nachweis, lag typischerweise in den Periportalfeldern, besonders in der arteriellen Media, in wenigen Fällen zudem im Gallengangsepithel. 21 Proben (77,8 %) des Toxin exponierten Gewebes lieferten eine positive Färbereaktion, dagegen 6 (22,2 %) eine negative, wogegen sich in der Gruppe ohne Substanzeneinfluss 15 (57,7 %) positiv und 11 (42,3 %) negativ ergaben. Die Fälle mit kardialer Vorbelastung lieferten 16 (64 %)

positive und 9 (36 %) negative Befunde, ohne Herzerkrankung waren 19 (70,4 %) positiv und 8 (29,6%) negativ. Die Gruppe mit einer Liegezeit von weniger als einem Tag präsentierte 21 (75 %) positive Reaktionen und 7 (25 %) negative, die Gruppe mit einer Liegezeit über einem Tag 13 (56,5 %) positive und 10 (43,5 %) negative (Abbildungen 21-23).

### 3.2.2 Kontrollkollektiv Leber

Das Lebergewebe färbte sich in 27 (61,4 %) Fällen positiv hinsichtlich HSP 27 und in 17 (38,6 %) negativ (Abbildungen 18, 20). Die angefärbten Strukturen waren die gleichen, wie im Studienkollektiv beschrieben. Die Betrachtung der Fälle mit Toxinexposition lieferte in 11 (61,1 %) Fällen positive und in 7 (38,9 %) negative Befunde hinsichtlich HSP 27. Die Gruppe ohne Toxinnachweis beinhaltete 16 (61,5 %) positive und 10 (38,5 %) negative HSP Färbungen. In der Gruppe mit kardialer Vorbelastung wurden 7 (63,6 %) positive und 4 (36,4 %) negative Reaktionen nachgewiesen, ohne kardiale Vorbelastung fanden sich 20 (60,6 %) positive und 13 (39,4 %) negative Ergebnisse (Abbildungen 22).

### 3.2.3 Studienkollektiv Gehirn

Die untersuchten Gehirne boten eine Anzahl von 31 (58,5 %) HSP 27 positive und 22 (41,5 %) negative Färbungen (Abbildungen 19, 24). Hier wurden, wie in der Leber, die arteriellen Gefäßwände vor allem in der Hirnrinde, also der grauen Substanz, und gelegentlich in der weißen Substanz des Marks angefärbt. Die Fälle mit einer positiven Toxinanamnese zeigten eine positive Anfärbbarkeit mit HSP in 16 (59,3 %) Fällen, in 11 (40,7 %) eine negative. Die Gruppe ohne Toxinexposition konnte in 15 (57,7 %) positive und 11 (42,3 %) negative Fälle geteilt werden. 15 (57,7 %) der Fälle mit kardialer Vorbelastung färbten sich positiv, 11 (42,3 %) negativ. Ohne kardiale Vorbelastung wiesen die Präparate 16 (59,3 %) positive und 11 (40,7 %) negative Reaktionen mit HSP 27 auf. Das Kollektiv mit einer Liegezeit von weniger als einem Tag bot 15 (53,6 %) positive und 13 (46,4 %) negative Färbungen, die Gruppe mit einer Liegezeit von über einem Tag konnte in 14 (60,9 %) positive und 9 (39,1 %) negative Fälle geteilt werden (Abbildungen 25, 27).

### 3.2.4 Kontrollkollektiv Gehirn

In den Gehirnpräparaten lagen insgesamt 26 (59,1 %) positive und 18 (40,9 %) negative Befunde vor. Die Färbemuster erschienen histologisch gleich zu denen des

Studienkollektivs (Abbildungen 19, 24). In der Menge an Fällen mit bekannter Toxinexposition ließen sich 10 (55,6 %) positiv und 8 (44,4 %) negativ anfärben, ohne Toxine zeigten sich 16 (61,5 %) positive und 10 (38,5 %) negative Färberesultate. Die Gruppe mit kardialer Vorbelastung wies 6 (54,5 %) positive und 5 (45,5 %) negative Färbungen auf, ohne kardiale Anamnese boten sich 20 (60,6 %) positive und 13 (39,4 %) negative Fälle (Abbildungen 26).

**Tab. 4:** Übersichtstabellen der immunhistochemischen Untersuchungen von HSP 27 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs mit Angabe der absoluten Zahlen positiver und negativer Färbeergebnisse.

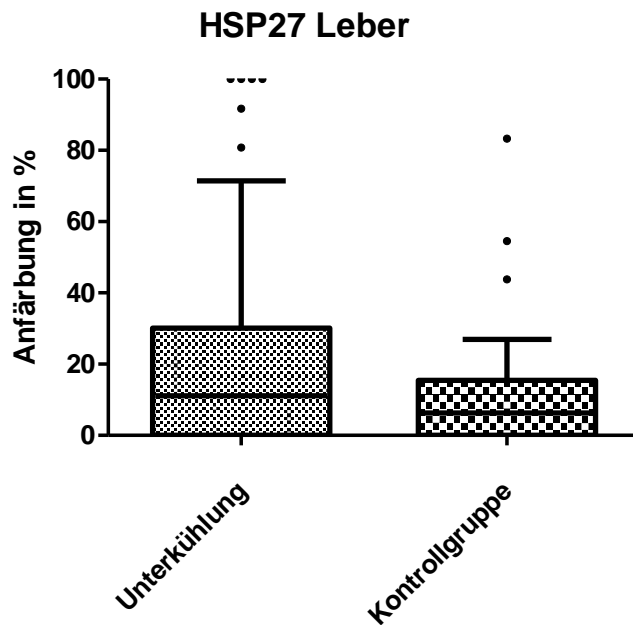
HSP 27		
	Positiv	Negativ
Leber Unterkühlung	36	17
Leber Kontrolle	27	17
Gehirn Unterkühlung	31	22
Gehirn Kontrolle	26	18

**Tab. 5:** Auflistung der Färbeergebnisse (Positiv und Negativ) von HSP 27 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs in absoluten Zahlen in Hinblick auf die Einflussfaktoren „Kardiale Vorbelastung“, „Intoxikation“ (mit Alkohol oder anderweitigen Substanzen s.o.).

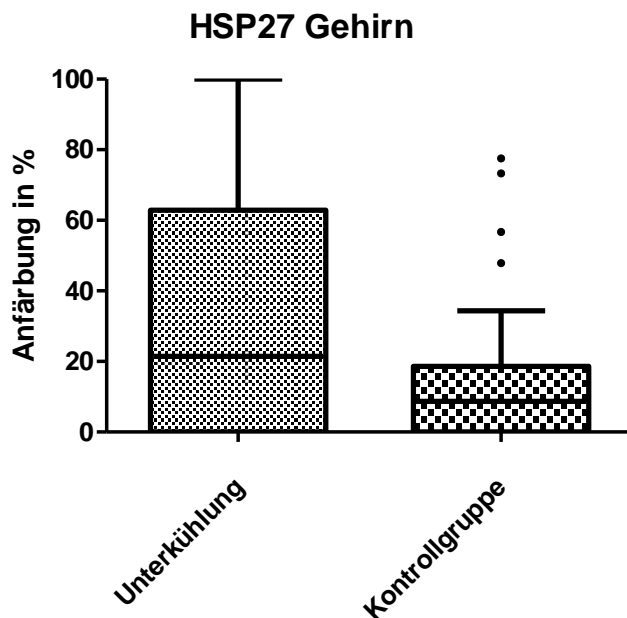
HSP 27								
	Kardiale Vorbelastung		Keine kardiale Vorbelastung		Intoxikation		Keine Intoxikation	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Leber Unterkühlung	16	9	19	8	21	6	15	11
Leber Kontrolle	7	4	20	13	11	7	16	10
Gehirn Unterkühlung	15	11	16	11	16	11	15	11
Gehirn Kontrolle	6	5	20	13	10	8	16	10

**Tab. 6:** Auflistung der Färbeergebnisse (Positiv und Negativ) von HSP 27 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs in absoluten Zahlen in Hinblick auf den Einflussfaktor „Liegezeit“.

HSP 27				
	Liegezeit < 1 Tag		Liegezeit > 1 Tag	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Leber Unterkühlung	21	7	13	10
Gehirn Unterkühlung	15	13	14	9



**Abb. 18:** Vergleich zwischen Unterkühlungs- und Kontrollgruppe der Lebergewebsproben nach Anfärbung von HSP 27 auf der X-Achse; Prozentualer Anteil der positiven Färbung in einer Probe, Verteilung aller Einzelproben auf der y-Achse; Unterkühlung n= 53, Kontrollgruppe n= 44. Darstellung von Streuung, Median ( $M_{UK} = 11,11$ ;  $M_{Ktl} = 6,25$ ), 75%-Perzentile ( $Q_{3(UK)} = 30,13$ ;  $Q_{3(Ktl)} = 15,47$ ).  $p=0,1095$

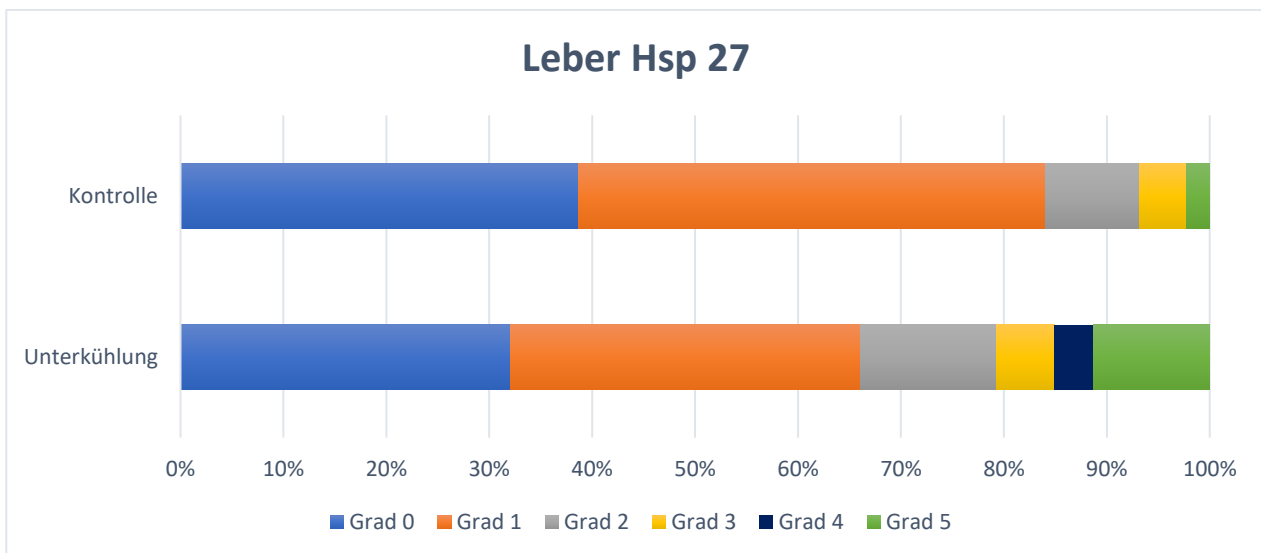


**Abb. 19:** Vergleich zwischen Unterkühlungs- und Kontrollgruppe der Gehirngewebsproben nach Anfärbung von HSP 27 auf der X-Achse; Prozentualer Anteil der positiven Färbung in einer Probe, Verteilung aller Einzelproben auf der y-Achse; Unterkühlung n= 53, Kontrollgruppe n= 44. Darstellung von Streuung, Median ( $M_{UK} = 21,43$ ;  $M_{Ktl} = 8,69$ ), 75%-Perzentile ( $Q_{3(UK)} = 62,92$ ;  $Q_{3(Ktl)} = 18,66$ ).  $p=0,0634$

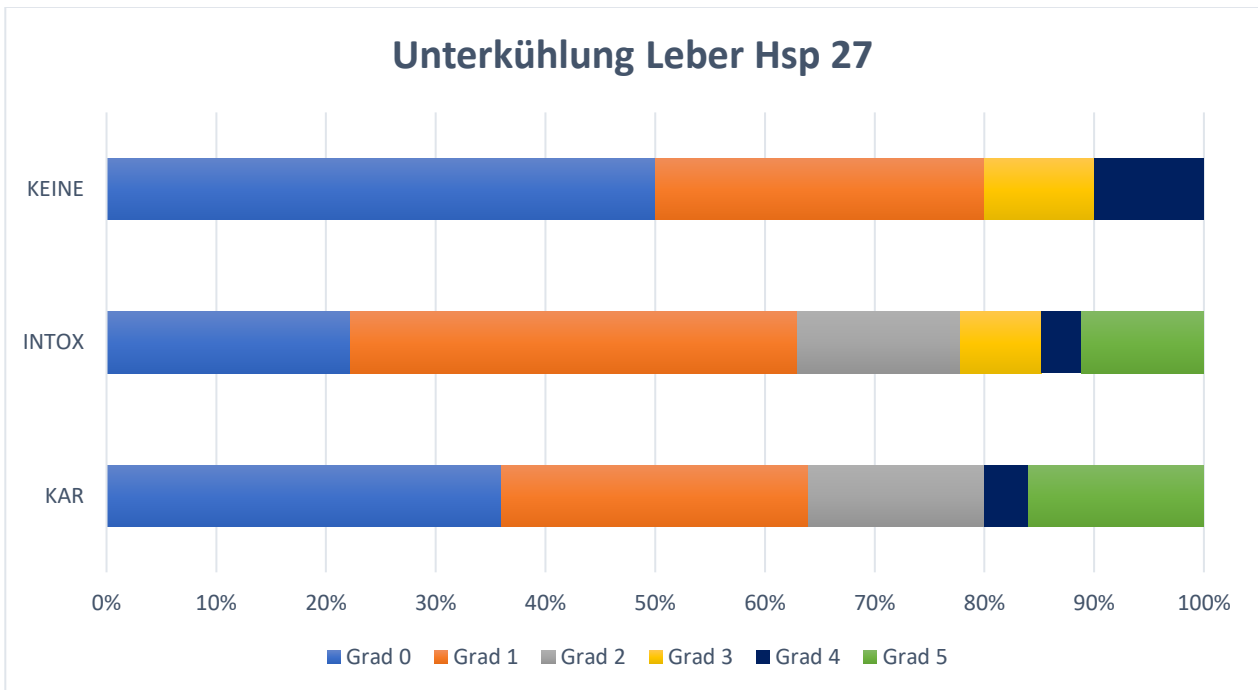
### 3.3 Färbegrade von HSP 27

#### 3.3.1 Färbegrade HSP 27 Leber

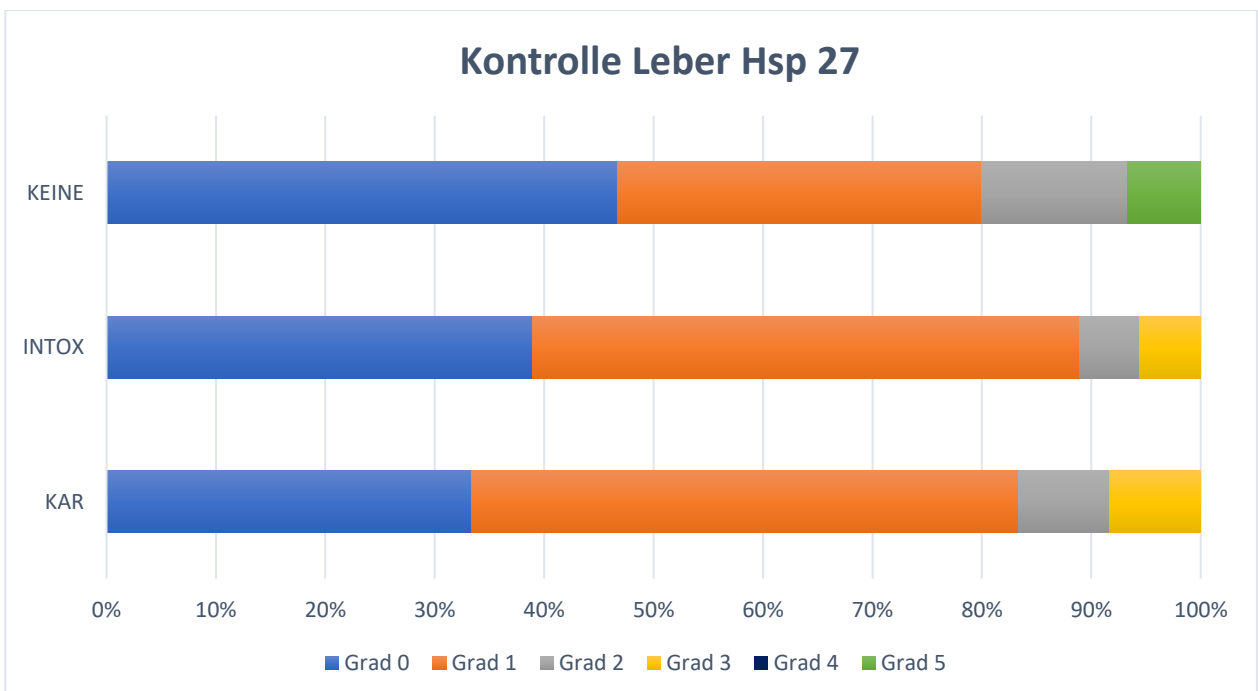
Im Lebergewebe fand sich keine signifikant höhere Expression von HSP 27 ( $p=0,1095$ ) im Studienkollektiv (Abbildung 18), sodass keine eindeutige Korrelation zwischen steigender Expression von HSP 27 und der Todesursache der Unterkühlung geschlussfolgert werden kann. Die Graduierung präsentierte sich ähnlich der der Gehirnproben. Im Falle einer Unterkühlung zeigte sich eine gesteigerte Frequenz der positiven Färbung, als in den Kontrollen, wobei diese nicht als signifikant zu werten ist. Es wurden 18 von 53 (34 %) Proben im Unterkühlungskollektiv mit Grad 2 oder höher deklariert, im Falle der Kontrollgruppe waren es 7 von 44 (15,9 %), welches zwar weniger als die Hälfte der Menge in der Studiengruppe darstellte, allerdings waren die Anteile der höher graduierten Proben, also Grad 3-5, in den jeweiligen Gruppen gering (Abbildung 20). Es fanden sich keine signifikanten Einflüsse durch ergänzende Faktoren, es bestanden lediglich leicht höhere Färbegrade im Falle einer kardialen Vorbelastung und einer Intoxikation im Studienkollektiv (Abbildung 21) sowie im Vergleich der Liegezeiten, wobei eine Liegezeit von unter einem Tag mit einer etwas höheren Quantität an positiven Färbungen und auch mit einem höheren Anteil an Färbegraden 3-5 einhergeht (Abbildung 23).



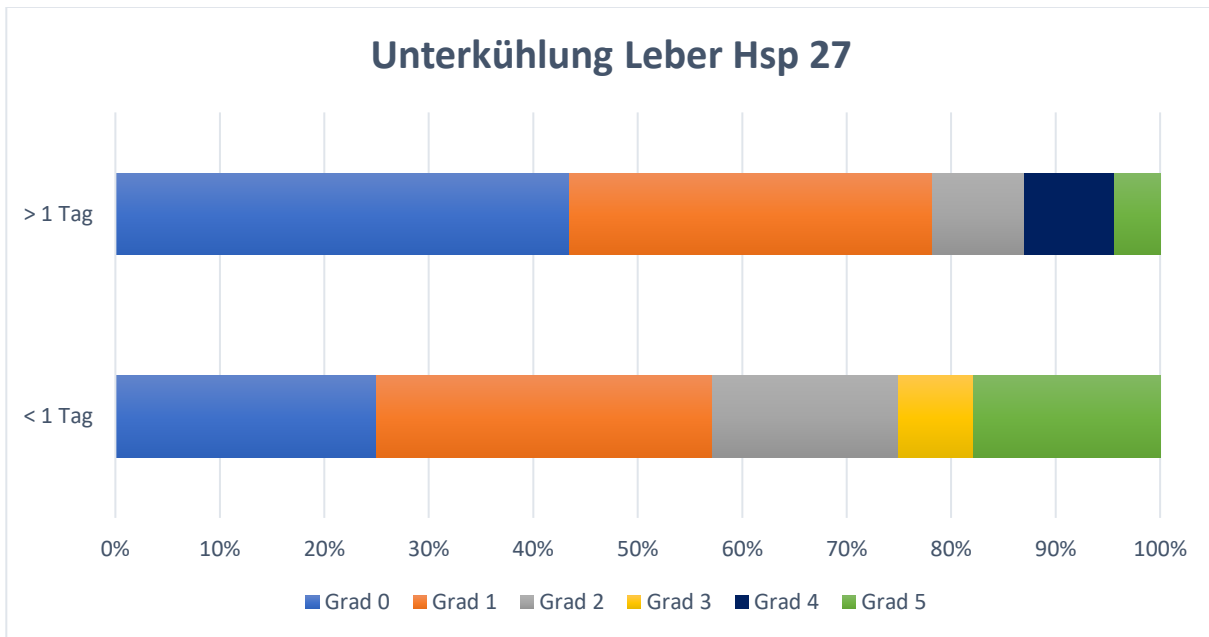
**Abb. 20:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektivs und des Kontrollkollektivs im relativen Vergleich



**Abb. 21:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich



**Abb. 22:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Leberpräparaten des Kontrollkollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich



**Abb. 23:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektivs mit einer Leichenliegezeit über einem Tag also 24 Stunden (> 1 Tag) und unter einem Tag (< 1 Tag) im relativen Vergleich

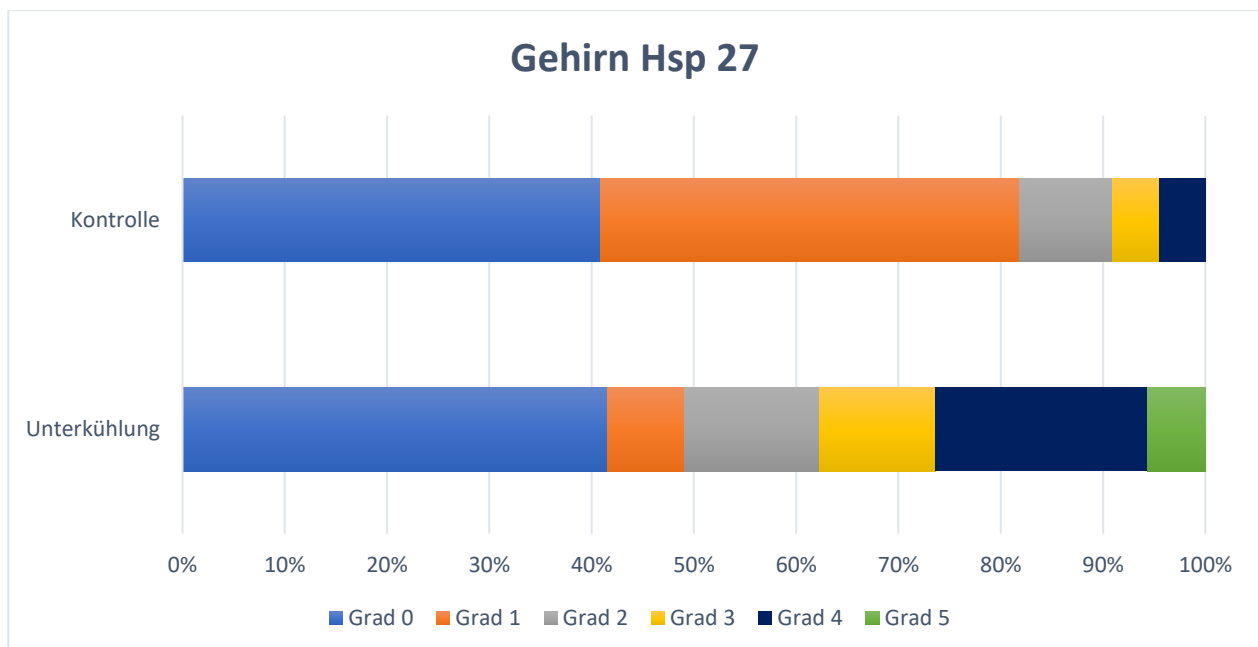
### 3.3.2 Färbegrade HSP 27 Gehirn

Zieht man die vorliegenden Befunde in Betracht, präsentierten die Gehirnschnitte keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorliegen von HSP 27 und der Todesursache Unterkühlung. Allerdings lag im Studienkollektiv die Expression im Vergleich in höherer Ausprägung vor (Abbildung 19). Diese Abbildung zeigt eine nahezu identische Streuung der positiv gefärbten Proben, wobei die 75%-Perzentile in der Unterkühlungsgruppe höher ermittelt wurde, als in der Kontrollgruppe. Daher erfolgte eine Graduierung der Färbeintensitäten. Diese ergab eine höhere Quantität von HSP 27 im Unterkühlungskollektiv. Es waren 27 von 53, also 50,9 % der Proben mit einem Grad 2 oder mehr versehen worden, im Vergleich dazu waren es beim Kontrollkollektiv lediglich 8 von 44, also 18,2 % (Abbildung 24), sodass von einem positiven Einfluss von Kälte auf die Expression von HSP 27 geschlossen werden kann. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie von Sharp et al. (2013) wurde in dieser Arbeit HSP 27 nicht in Astrozyten, sondern in den Gefäßwänden cerebraler Arterien nachgewiesen.

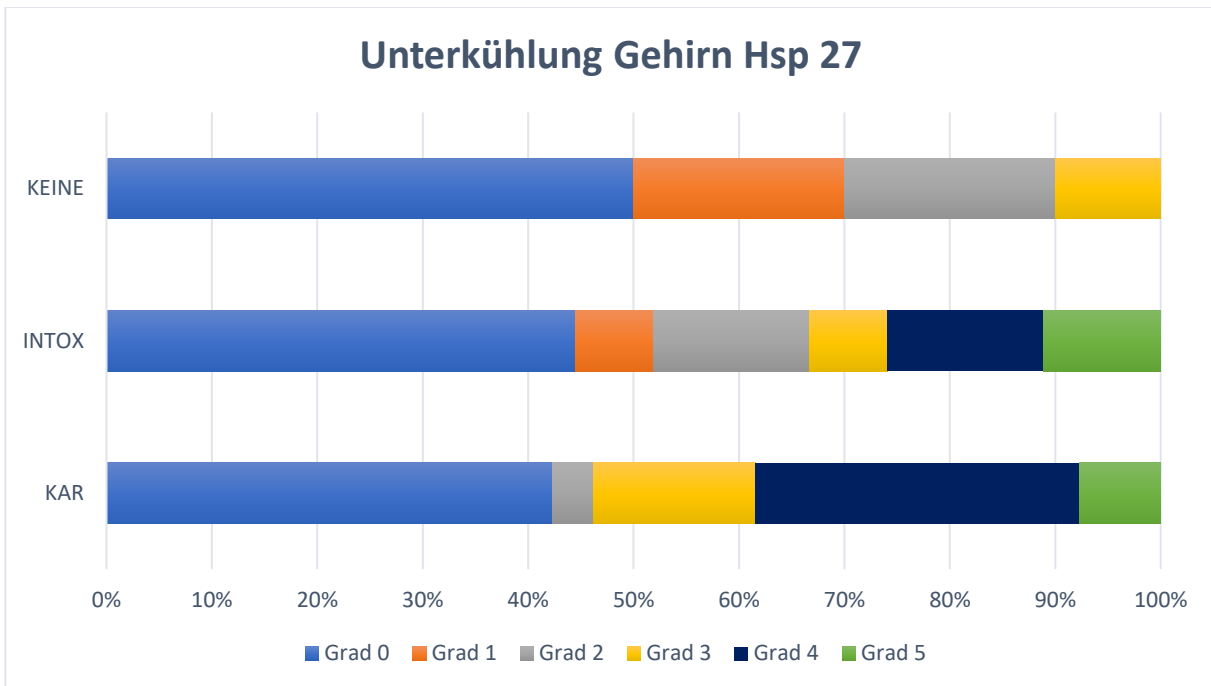


Keines der untersuchten Einflussfaktoren ergab in der Quantität der positiven Färbungen eine ausschlaggebende Korrelation zur Expression von HSP 27. Hingegen fand sich aber nach Betrachtung der Graduierungen eine stark gesteigerte Expression bei Vorliegen einer begleitenden kardialen Erkrankung. Es lagen 14 von 26 (53,8 %) Fälle im Unterkühlungskollektiv mit begleitender kardialer Vorschädigung vor, welche mit Grad 3 oder höher einzustufen waren; daneben fanden sich sogar die Grade 4 und 5, welche ohne kardiale Nebeneinflüsse nicht zu finden waren. In der Gruppe ohne kardiale Belastung wurde lediglich 1 Probe von 10 (10 %) mit einem Grad 3 versehen (Abbildungen 25-27). Die Betrachtung der Liegezeiten ergab 12 von 28 (42,9 %) Fälle mit einem Färbegrad von 3-5 bei < 1 Tag und einen Anteil von 6 von 22 (27,3 %) mit Färbegrad 3-5 bei einer Liegezeit von > 1 Tag (Abbildung 27). Im Kontrollkollektiv fanden sich lediglich Einzelfälle mit einem Färbegrad von 3 und 4 sowohl mit begleitender kardialer Anamnese und Intoxikation als auch ohne Begleitfaktoren (Abbildung 26).

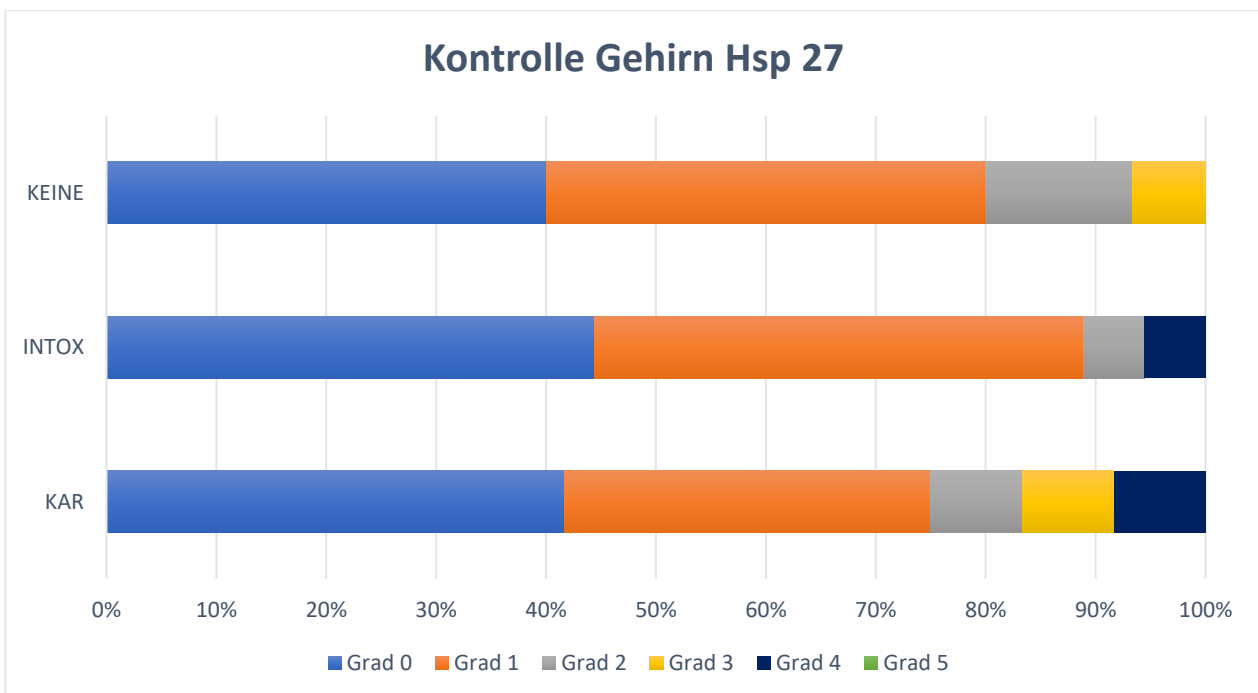
Ebenso bestand ein identischer relativer Anteil positiv gefärbter Präparate in beiden Gruppen, allerdings gesteigerte Färbegrade in der Untersuchung der Gehirnanschnitte des Studienkollektivs (Abbildung 24).



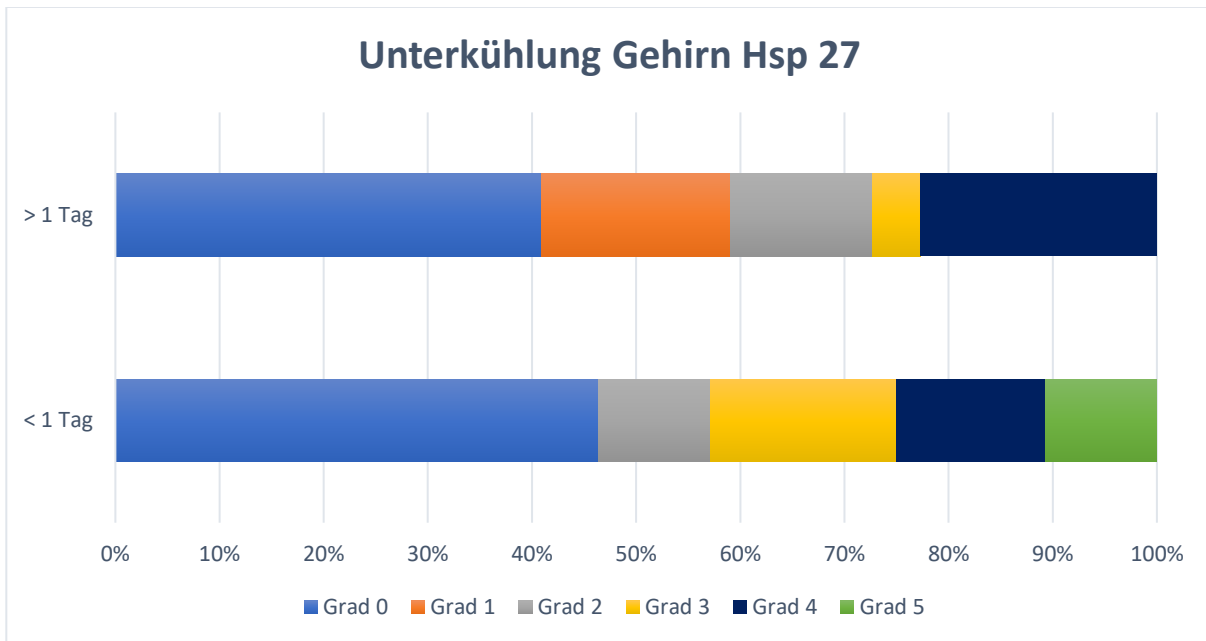
**Abb. 24:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs und des Kontrollkollektivs im relativen Vergleich



**Abb. 25:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich



**Abb. 26:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Gehirnpräparaten des Kontrollkollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich



**Abb. 27:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs mit einer Leichenliegezeit über einem Tag also 24 Stunden (> 1 Tag) und unter einem Tag (< 1 Tag) im relativen Vergleich

### 3.4 Expression von HSP 60

#### 3.4.1 Studienkollektiv Leber

Das Studienkollektiv beinhaltete 2 (3,8 %) positive und 51 (96,2 %) negative Färbeergebnisse im Falle der Leberanschnitte (Abbildungen 28, 30). Die angefärbten Strukturen fanden sich wie bereits bei HSP 27 in den Periportalfeldern und teils subkapsulär, besonders als rote Anfärbungen in den Gallengangsepithelien und seltener in den Arterienwänden. Die Färbeintensität unterschied sich bei HSP 60 nicht, lediglich die Frequenz zeigte sich verschieden. Die Betrachtung der verschiedenen Einflussfaktoren war aufgrund der lediglich 2 positiv gefärbten Präparate im Vergleich zu den 51 negativen und damit sehr ungleichen Größe der Gruppen nicht zielführend (Abbildung 31).

#### 3.4.2 Kontrollkollektiv Leber

In der Kontrollgruppe von HSP 60 zeigten sich im Falle der Leber 9 (20,5 %) Anschnitte positiv und 35 (79,5 %) negativ gefärbt (Abbildung 28, 30). Die angefärbten Strukturen glichen denen in der Studiengruppe. Die Betrachtung der Toxinexposition lieferte 4 (22,2

%) positive und 14 (77,8 %) negative Reaktionen. Das Toxin-freie Kollektiv ließ sich in 6 (23,1 %) positive und 20 (76,9 %) negative Befunde einteilen. Die Betrachtung der kardialen Vorbelastung erbrachte 4 (36,4 %) positive und 7 (63,6 %) negative Fälle, ohne kardiale Vorbelastung lagen 6 (18,2 %) positiv und 27 (81,8 %) negativ gefärbte Präparate vor (Abbildung 32).

#### 3.4.3 Studienkollektiv Gehirn

Die Gehirnpräparate wiesen 16 (30,2 %) positive und 37 (69,8 %) negative Reaktionen mit HSP 60 auf (Abbildungen 29, 33). Die Lokalisation der roten Färbung war im Endothel der Kapillaren über das komplette Hirngewebe verteilt zu sehen, insbesondere aber im Cortex. Die Farbintensität unterschied sich nicht, die Frequenz war variabel. In Hinblick auf die untersuchten Einflussfaktoren fanden sich 7 (25,9 %) positiv und 20 (74,1 %) negativ gefärbte Anschnitte mit bekannter Exposition zu Toxinen. Ohne Toxine ließen sich 8 (30,8 %) positive und 18 (69,2 %) negative Reaktionen feststellen. In der Gruppe mit kardialer Vorbelastung lagen 8 (30,8 %) positive und 18 (69,2 %) negative, ohne kardiale Auffälligkeiten 8 (29,6 %) positive und 19 (70,4 %) negative Befunde vor. Die Liegezeit von weniger als einem Tag bot eine Anzahl von 7 (25 %) positiven Färbungen und 21 (75 %) negativen, bei einer Liegezeit von mehr als einem Tag kamen 9 (39,1 %) Fälle positiv und 14 (60,9 %) negativ gefärbt zur Darstellung (Abbildungen 34, 35).

#### 3.4.4 Kontrollkollektiv Gehirn

Das Kontrollkollektiv der Gehirnanschnitte beinhaltete 16 (36,4 %) positive und 28 (63,6 %) negative Reaktionen (Abbildungen 29, 33). Wie im Studienkollektiv färbten sich hier die Kapillarendothelien mit gleicher Intensität an. In Hinblick auf die Einflussfaktoren fanden sich 6 (33,3 %) positive und 12 (66,7 %) negative Färbungen in Zusammenhang mit Toxinen, wogegen 10 (38,5 %) positive und 16 (61,5 %) negative Befunde ohne Toxineinfluss nachzuweisen waren. Die Betrachtung der kardialen Vorbelastung ergab 4 (36,4 %) positive und 7 (63,6 %) negative Ergebnisse. Die Gruppe ohne nachgewiesene kardiale Anamnese lieferte eine Anzahl von 12 (36,4 %) positiven und 21 (63,6 %) negativen Reaktionen. (Abbildung 36).

**Tab. 7:** Übersichtstabellen der immunhistochemischen Untersuchungen von HSP 60 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs mit Angabe der absoluten Zahlen positiver und negativer Färbeergergebnisse.

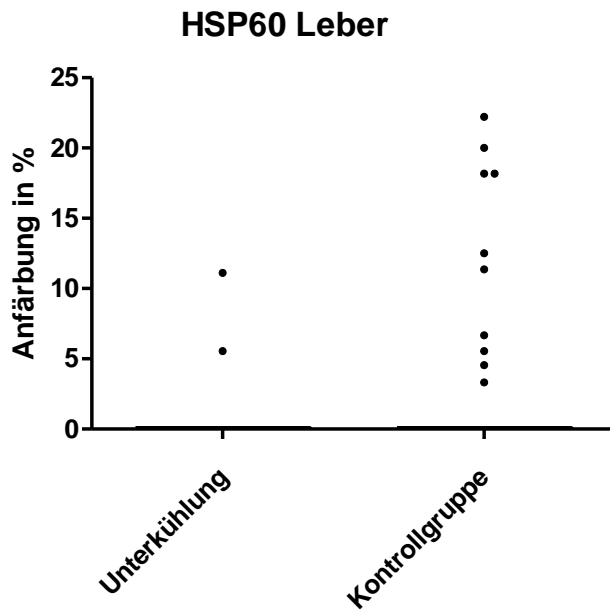
<b>HSP 60</b>		
	Positiv	Negativ
Leber Unterkühlung	2	51
Leber Kontrolle	9	35
Gehirn Unterkühlung	16	37
Gehirn Kontrolle	16	28

**Tab. 8:** Auflistung der Färbeergergebnisse (Positiv und Negativ) von HSP 60 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs in absoluten Zahlen in Hinblick auf die Einflussfaktoren „Kardiale Vorbelastung“, „Intoxikation“ (mit Alkohol oder anderweitigen Substanzen s.o.).

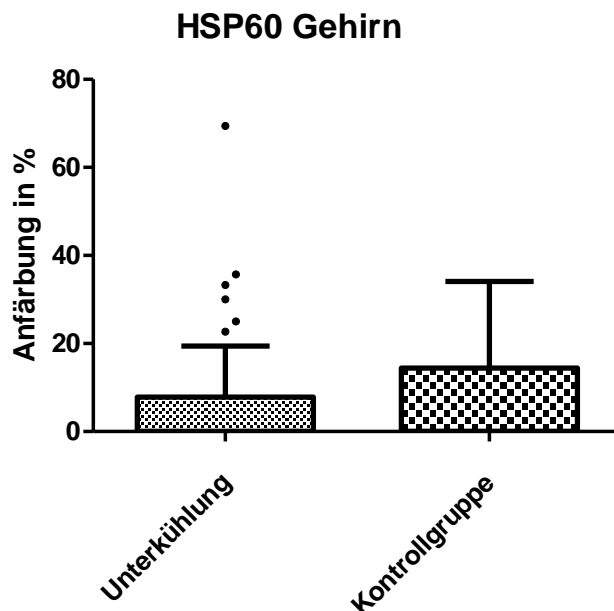
<b>HSP 60</b>								
	Kardiale Vorbelastung		Keine kardiale Vorbelastung		Intoxikation		Keine Intoxikation	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Leber Unterkühlung	1	25	1	26	1	26	1	25
Leber Kontrolle	4	7	6	27	4	14	6	20
Gehirn Unterkühlung	8	18	8	19	7	20	8	18
Gehirn Kontrolle	4	7	12	21	6	12	10	16

**Tab. 9:** Auflistung der Färbeergergebnisse (Positiv und Negativ) von HSP 60 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs in absoluten Zahlen in Hinblick auf den Einflussfaktor „Liegezeit“.

<b>HSP 60</b>				
	Liegezeit < 1 Tag		Liegezeit > 1 Tag	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Leber Unterkühlung	1	26	1	25
Gehirn Unterkühlung	7	21	9	14



**Abb. 28:** Vergleich zwischen Unterkühlungs- und Kontrollgruppe der Lebergewebsproben nach Anfärbung von HSP 60 auf der X-Achse; Prozentualer Anteil der positiven Färbung in einer Probe, Verteilung aller Einzelproben auf der y-Achse; Unterkühlung n= 53, Kontrollgruppe n= 44. Darstellung von Streuung, Median ( $M_{UK} = 0$ ;  $M_{Ktl} = 0$ ), 75%-Perzentile ( $Q_{3(UK)} = 0$ ;  $Q_{3(Ktl)} = 0$ ).  $p=0,0045$



**Abb. 29:** Vergleich zwischen Unterkühlungs- und Kontrollgruppe der Gehirngewebsproben nach Anfärbung von HSP 60 auf der X-Achse; Prozentualer Anteil der positiven Färbung in einer Probe, Verteilung aller Einzelproben auf der y-Achse; Unterkühlung n= 53, Kontrollgruppe n= 44. Darstellung von Streuung, Median ( $M_{UK} = 0$ ;  $M_{Ktl} = 0$ ), 75%-Perzentile ( $Q_{3(UK)} = 7,85$ ;  $Q_{3(Ktl)} = 14,44$ ).  $p=0,4800$

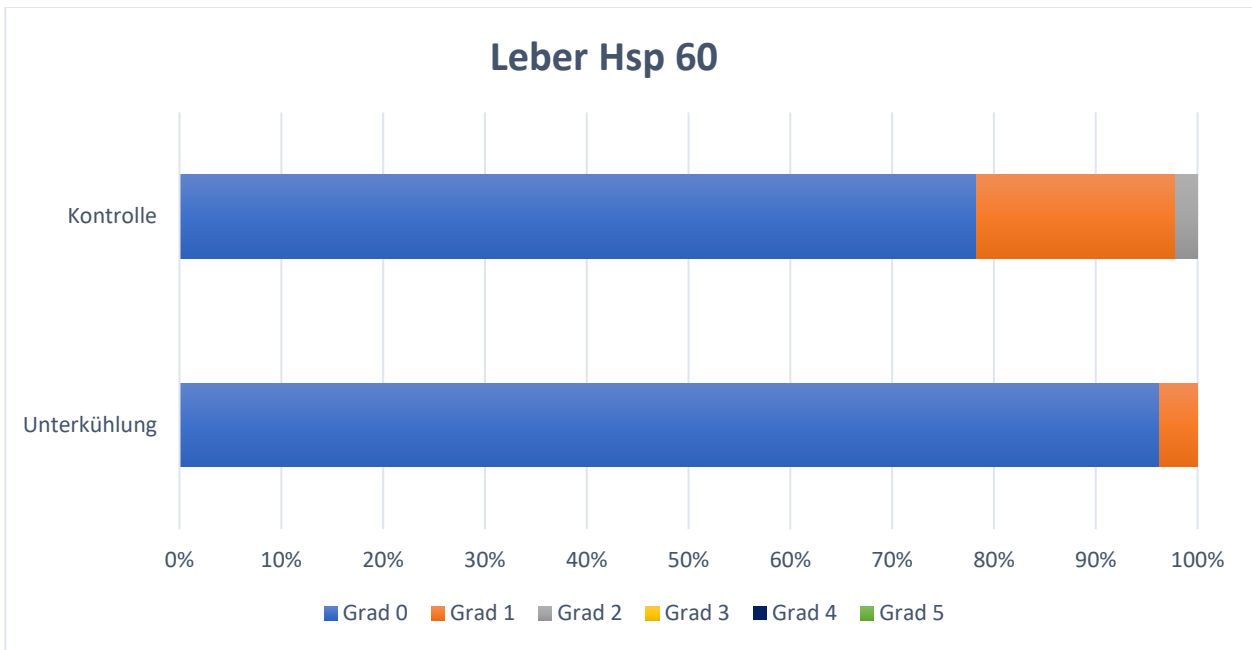
### 3.5 Färbegrade von HSP 60

#### 3.5.1 Färbegrade HSP 60 Leber

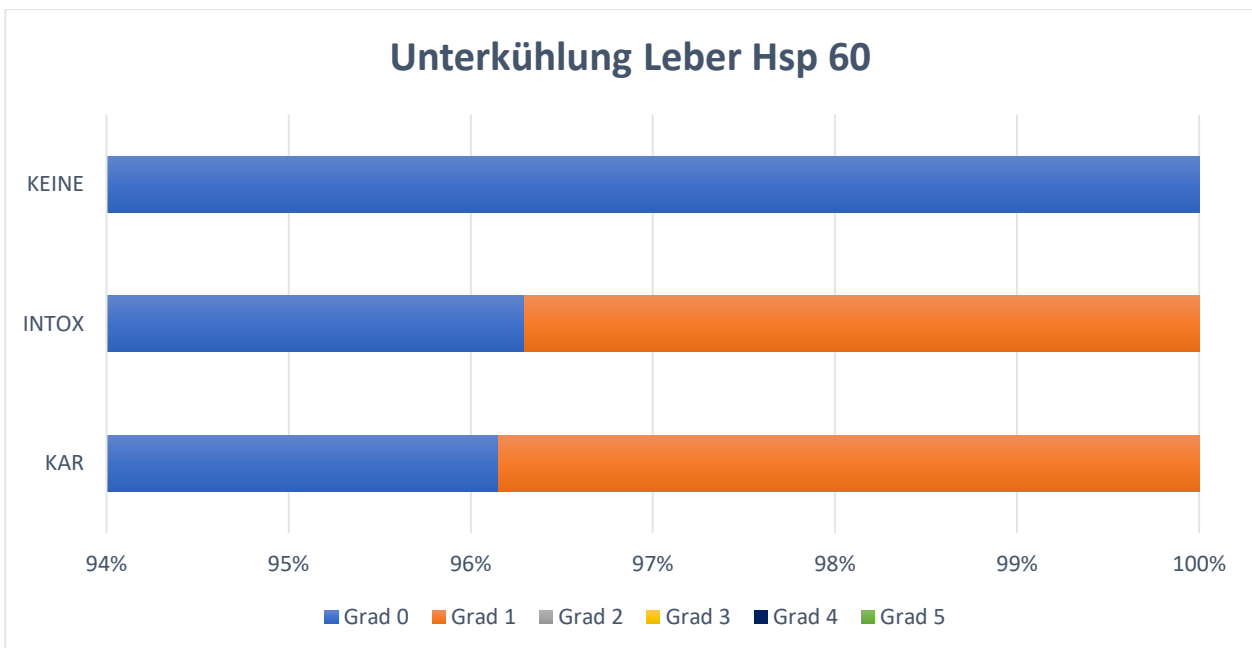
Hier scheint es, als sei im Gegensatz zu den untersuchten HSP 27 Proben die Färbeintensität in der Gruppe mit einer Liegezeit über einem Tag marginal höher. Damit scheint die Liegezeit Einfluss auf die Expression von HSP zu nehmen, allerdings nicht in die gleiche Richtung. Es muss erwähnt werden, dass demnach möglichst einheitliche Begleitkriterien in den jeweiligen Kollektiven von maßgeblicher Wichtigkeit sind. Limitierend ist auch zu beachten, dass im Falle der Kontrollgruppe lediglich 9 von 44 Präparaten eine Expression von HSP 60 in der Leber unabhängig vom Grad der Färbung aufwiesen, sodass ein geringer relativer Anteil von Präparaten mit HSP Nachweis von 20,5 % dem Studienkollektiv mit einem positiven relativen Anteil von 3,8 % gegenübergestellt wird (Abbildungen 30-32).

#### 3.5.2 Färbegrade HSP 60 Gehirn

Die Auswertung der Färbegrade lieferte hier keine signifikanten Unterschiede. Alle positiv gefärbten Präparate wiesen lediglich einen Grad 1 oder 2 in nahezu gleicher Verteilung auf, lediglich ein Einzelfall konnte im Studienkollektiv mit Grad 4 gekennzeichnet werden (Abbildungen 33-36). Es muss allerdings erneut auf die geringere Anzahl der Proben mit HSP 60 Nachweis, sowohl im Studien-, als auch im Kontrollkollektiv hingewiesen werden.

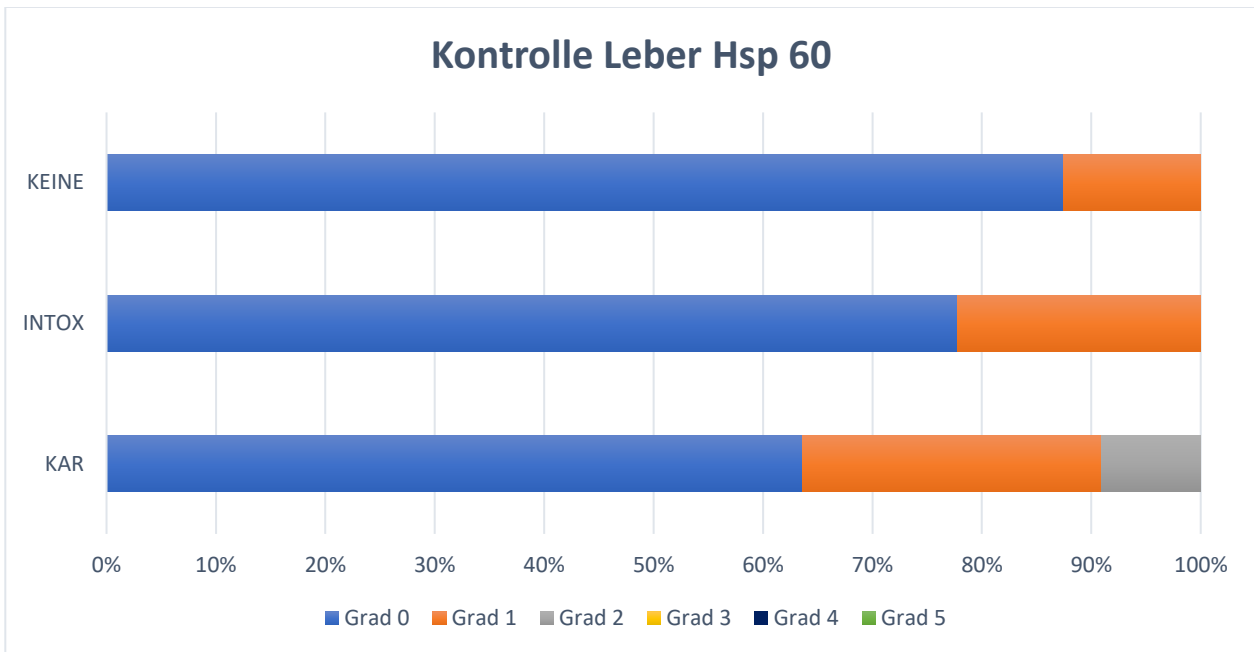


**Abb. 30:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektivs und des Kontrollkollektivs im relativen Vergleich

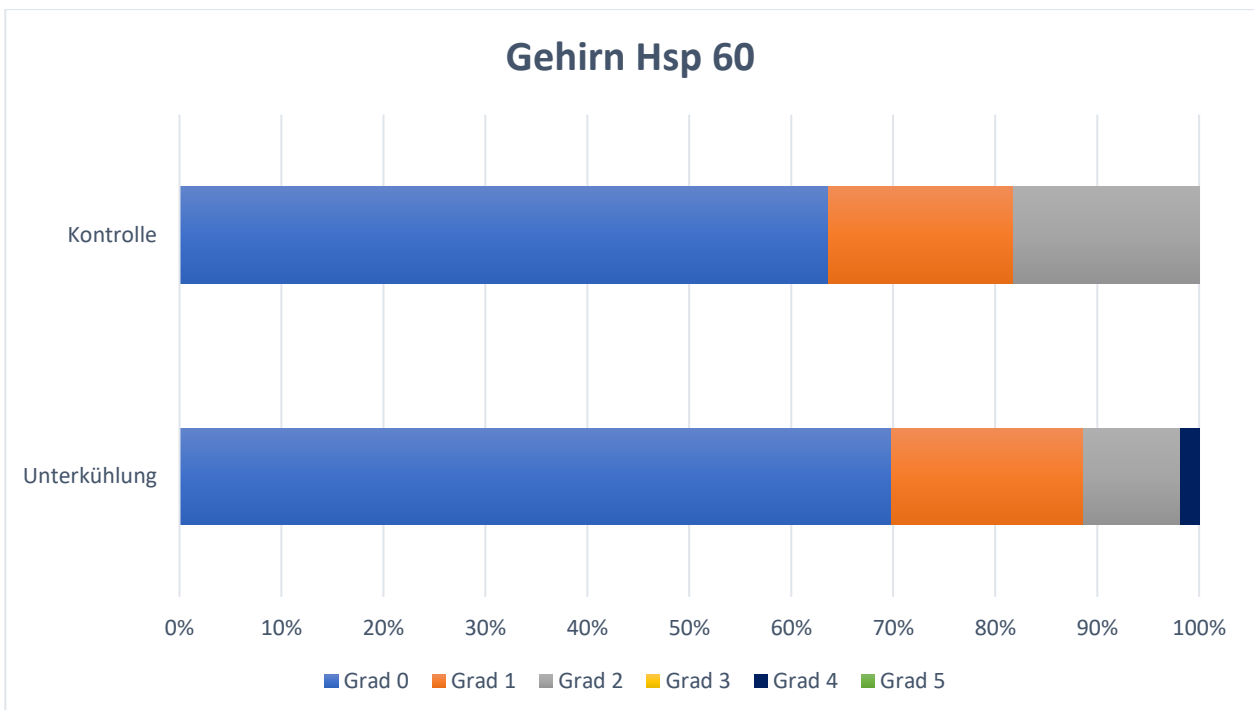


**Abb. 31:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich

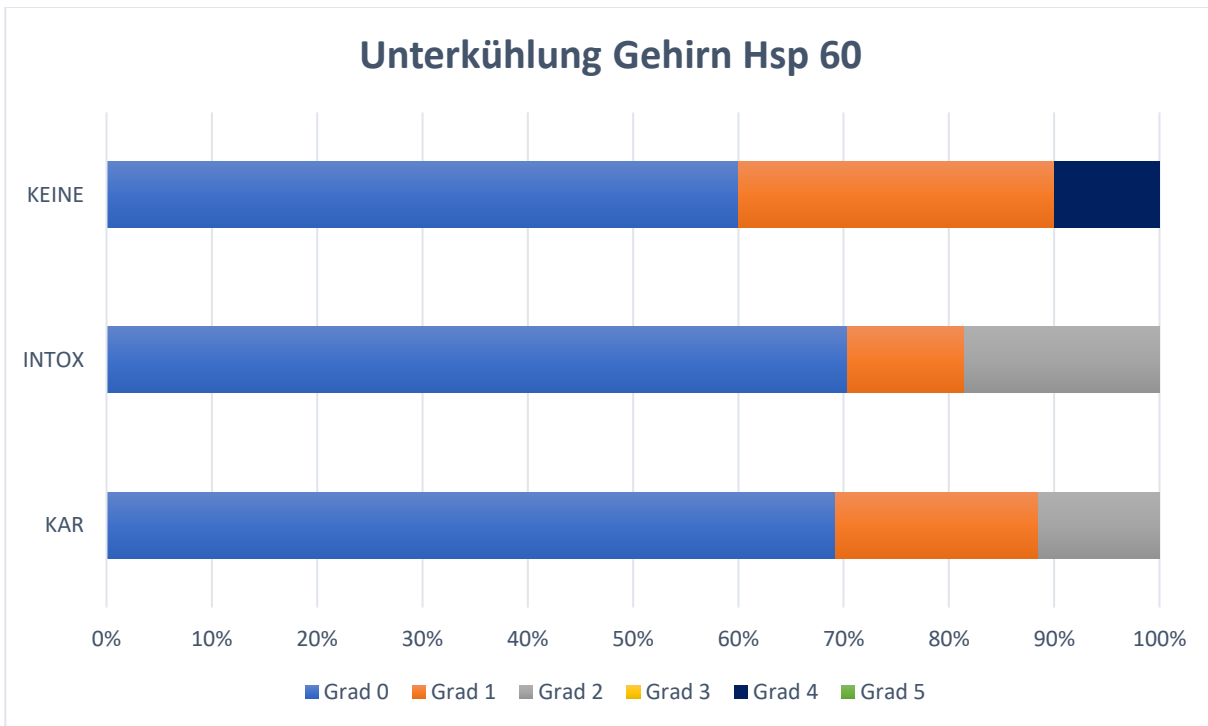




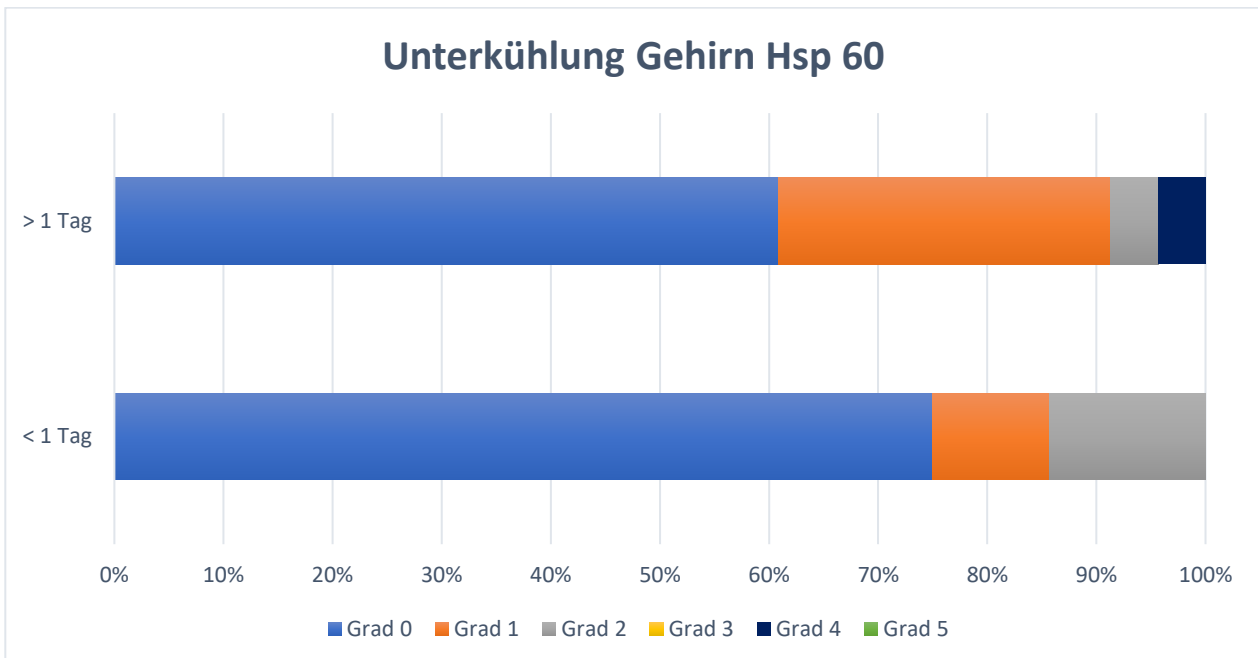
**Abb. 32:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Leberpräparaten des Kontrollkollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich



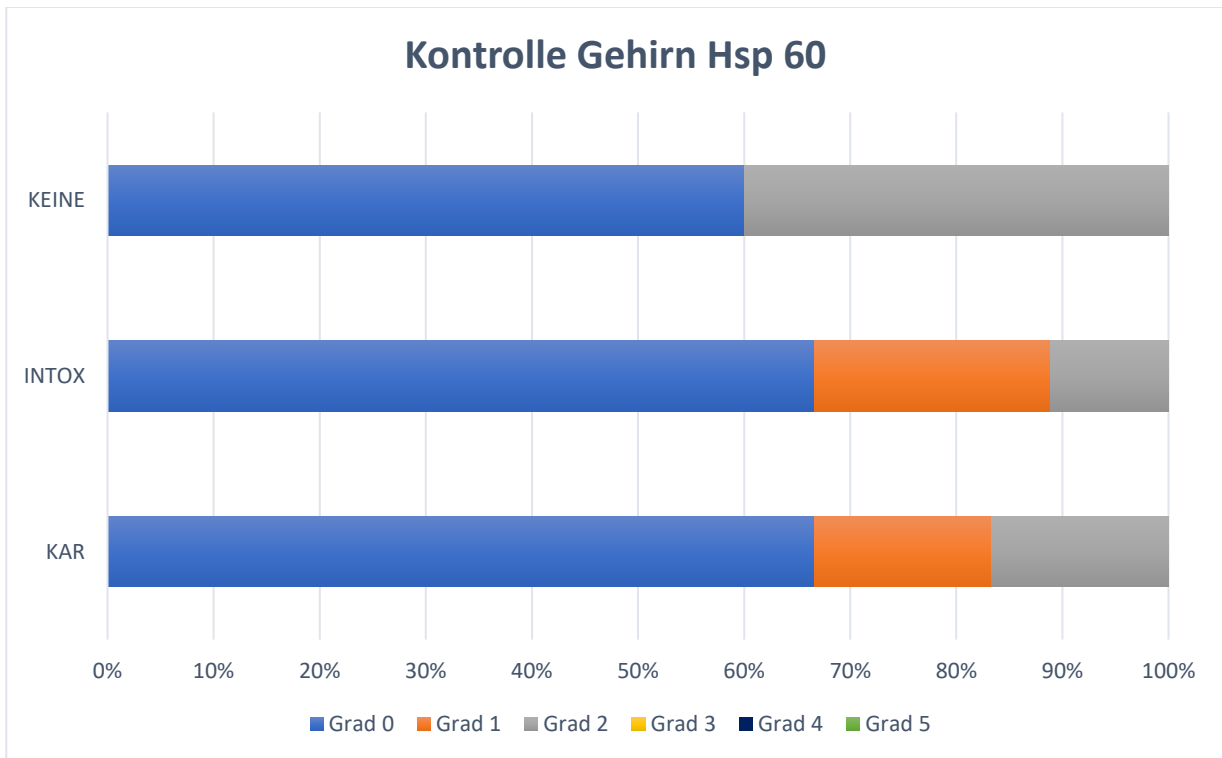
**Abb. 33:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs und des Kontrollkollektivs im relativen Vergleich



**Abb. 34:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich



**Abb. 35:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs mit einer Leichenliegezeit über einem Tag also 24 Stunden (> 1 Tag) und unter einem Tag (< 1 Tag) im relativen Vergleich



**Abb. 36:** Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Gehirnpräparaten des Kontrollkollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich

## 4. Diskussion

Ergänzende Methoden zur Diagnosestellung einer Unterkühlung scheinen nicht trivial zu sein, da bislang die Diagnose anhand mikro- und makroskopischer Befunde, welche aber unterschiedlich sensitiv vorliegen, sowie in Zusammenschau mit der Auffindesituation gestellt werden kann. Daher bieten sich weitere Untersuchungen, wie z.B. die Immunhistochemie als erweiterte Maßnahme an. Doberentz et al. (2017) untersuchten Hypophysen nach Unterkühlungstod auf HSP 27 und 70, was keinen signifikanten Anstieg der Heat Shock Proteine im Organ aufzeigen konnte. Lediglich histologische Veränderungen waren hinweisend auf eine zelluläre Umstrukturierung bedingt durch Kälteeinfluss. Preuß et al. (2008) analysierten HSP 70 in Nierengewebe. Hier konnte quantitativ keine Signifikanz im Vorliegen der HSP-Expression durch Unterkühlung aufgezeigt werden, allerdings gab es starke Hinweise auf eine gesteigerte Färbeintensität und damit ein quantitativ vermehrtes Vorkommen von Heat Shock Proteinen durch Unterkühlungseinfluss. In der aktuellen Arbeit lag der Fokus auf HSP 27, 60 und 70 in Leber- und Hirngewebe als Ergänzung zu den bereits untersuchten Organen.

### 4.1 Das Fehlen von HSP 70

Das Vorkommen von HSP bei Verdacht auf Tod durch Unterkühlung wurde bislang in Leber und Gehirn noch nicht untersucht. Doberentz et al. (2014) fanden eine gesteigerte Expression von HSP 70 in Tubuluszellen der Niere und Pneumozyten bei Brandtodesfällen, Preuß et al. (2008) konnten das Auftreten von HSP 70 in Nierenzellen nach Kälteeinfluss nachweisen, möglicherweise als ein Frühzeichen noch vor Sichtbarwerden makroskopischer Veränderungen. In der gegenwärtigen Studie wurde HSP 70 weder in Leber noch in Hirngewebe in Hypothermiefällen detektiert, wobei Currie et al. (2000) in ihrer Studie zeigten, dass eine schnelle Expression von HSP 70 essenziell für die Protektion von Neuronen zu sein scheint. Dies kann bedingt sein durch die Abhängigkeit der Funktion von HSP 70 vom vorliegendem ATP. Postmortal wird ATP abgebaut oder kann nicht mehr aus ADP umgewandelt werden, sodass davon auszugehen ist, dass HSP 70 viele Stunden oder gar Tage nach dem Tod nicht mehr zu

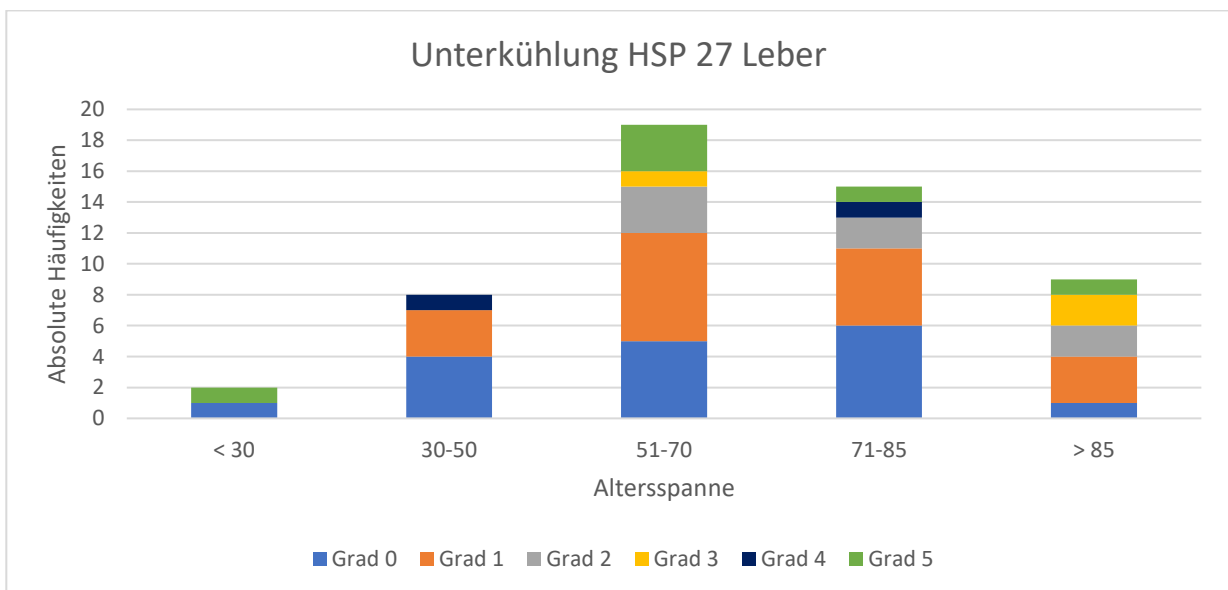
finden ist (Pfeifer et al., 2008). In dieser Studie wiesen die meisten Leichen eine postmortale Liegezeit von mehr als 2 Tagen auf, sodass diese Ergebnisse mit der Aussage von Pfeifer et al. (2008) korrelieren. Aufgrund der verlängerten Leichenliegezeit von Eintritt des Todes bis zur Organentnahme und -fixierung ist davon auszugehen, dass es bereits zu einem Abbau von ATP und konsekutiv von HSP 70 gekommen ist, was zu einer fehlenden Nachweisbarkeit in den untersuchten Gewebeproben geführt hat.

#### 4.2 Unterschiedliche Expression von Hitzeschockproteinen

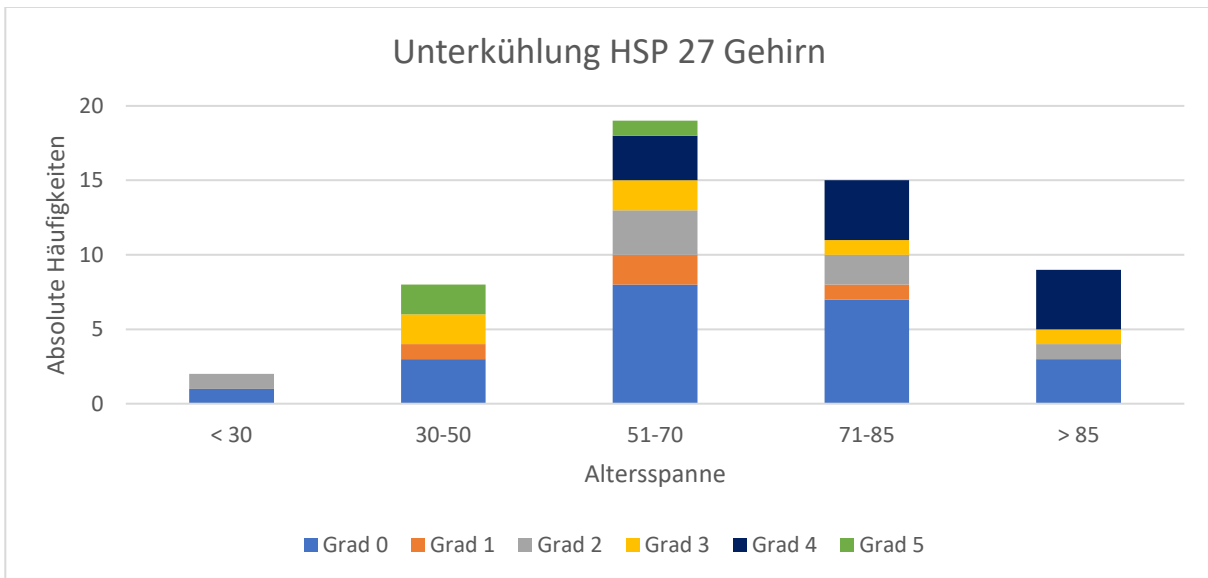
Insgesamt sind zahlreiche Faktoren beschrieben, welche die Expression von HSP bedingen, wie Ischämie, toxischer und oxidativer Stress und heiße Temperaturen, was wiederum zu einer gesteigerten HSP-Synthese als Reaktion auf intrinsische oder extrinsische Stressoren führt (Parsell und Lindquist, 1993; Tsokos et al., 2006; Vargas-Parada et al., 2001a). Im Gehirn sind HSP wichtige protektive Enzyme bei ischämischen Schlaganfällen, verschiedenen Erkrankungen des zentralen Nervensystems und direkten Verletzungen (Currie et al., 2000; Garrido et al., 2001; Hsu und Raine, 1981; Lowenstein et al., 1991), sodass in Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit ein Rückschluss auf Hypothermie als spezifischer Trigger der HSP-Expression aufgrund multipler Begleitfaktoren deutlich erschwert ist und daher identischer Untersuchungsbedingungen bedarf.

Es besteht die Möglichkeit, dass der Stressreiz nur sehr kurz und dafür sehr intensiv ausfiel, wodurch es nicht zu einer starken HSP-Expression kommen konnte. Im Falle der Unterkühlung ist dies eher unwahrscheinlich, da kalte Temperaturen in der Regel einen kontinuierlichen Reiz darstellen und der Körper physiologisch noch mit Kompensationsmechanismen reagiert (Geserick et al., 2018; Madea et al., 2004; Feder, 1999). Ebenfalls denkbar ist, dass in Zusammenspiel mit hohem Alter, damit verminderter Kompensationsfähigkeit des Organismus, und einem kurzen sehr starken exogenen Reiz mit raschem Todeseintritt die Expression und damit die anschließende Nachweisbarkeit von Heat Shock Proteinen nicht mehr gegeben war. Auf kurze, intensive Reize würden die Zellen weniger in die Apoptose geleitet werden, worauf HSP noch Einfluss nehmen könnten und es damit zur gesteigerten Expression kommen würde, sondern es wären

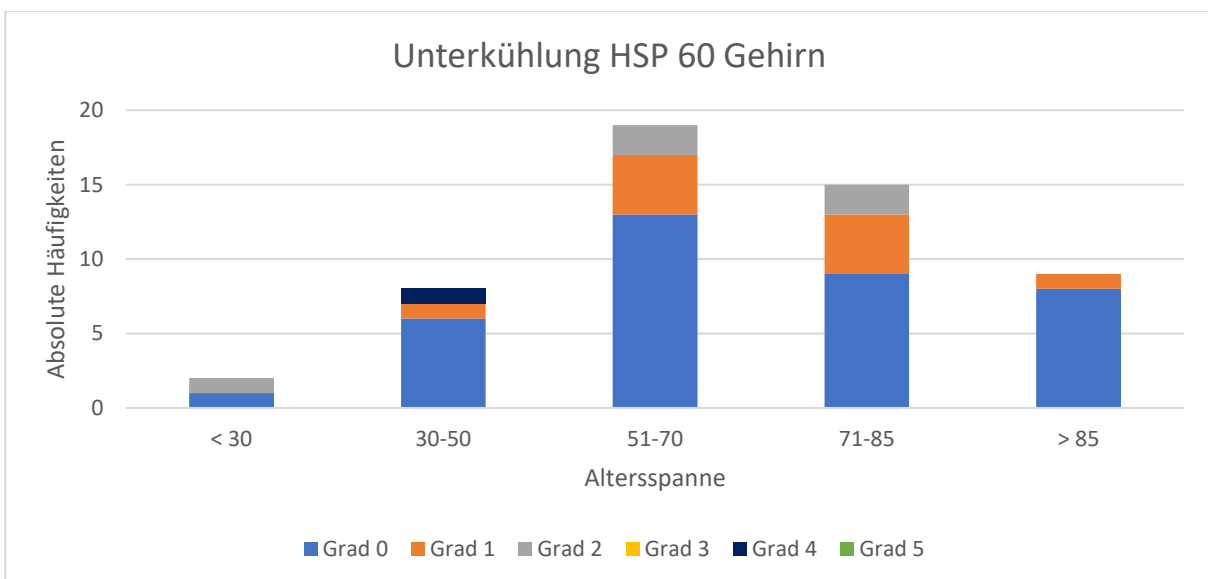
eher nekrotische Veränderungen mit Zerstörung großer Zellverbände denkbar, was durch HSP nicht beeinflusst werden kann und so auch keine Reaktionskaskade zur gesteigerten Expression der Proteine führen würde (Elmore, 2007; Garrido et al., 2006; Madea et al., 2004; Majno und Joris, 1995; Parcellier et al., 2003). In dieser Studie fand sich keine eindeutig gesteigerte HSP-Expression in einer bestimmten Altersspanne. Gegenteilig zu der Aussage, dass ein hohes Alter eher zu einer verminderten Nachweisbarkeit von HSP führt, ergab die Betrachtung der HSP-Expression und der Färbegrade in Abhängigkeit vom Alter keine eindeutige Korrelation. Sowohl bei geringem als auch bei hohem Alter der Verstorbenen zum Zeitpunkt des Todes konnten HSP nachgewiesen werden, auch jeweils mit niedrigen und hohen Färbegraden (Abbildungen 37-39). Widersprüchlich zu der Annahme, dass mit steigendem Alter die Kompensationsfähigkeit des Organismus im Umgang mit Stress sinkt und damit auch die Expression von HSP ausbleibt, fand sich in dieser Studie in der Gruppe der über 85 Jahre gewordenen bei Untersuchung von HSP 27 in der Leber lediglich 1 von insgesamt 9 Fällen ohne HSP Nachweis. Die übrigen 8 Fälle wiesen recht gleichmäßig Färbegrad 1, 2, 3 und 5 auf (Abbildung 37). Allerdings fiel bei der Betrachtung von HSP 27 im Gehirn auf, dass der höchste Anteil positiver Fälle und höhere Färbegrade bei 30-50 Jahre alt gewordenen nachweisen ließ, was für eine gesteigerte Stressreaktion und Möglichkeit der Kompensation des Organismus spricht (Abbildung 38).



**Abb. 37:** Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 in der Leber des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Lebensalterintervalle zum Zeitpunkt des Versterbens.



**Abb. 38:** Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Lebensalterintervalle zum Zeitpunkt des Versterbens.



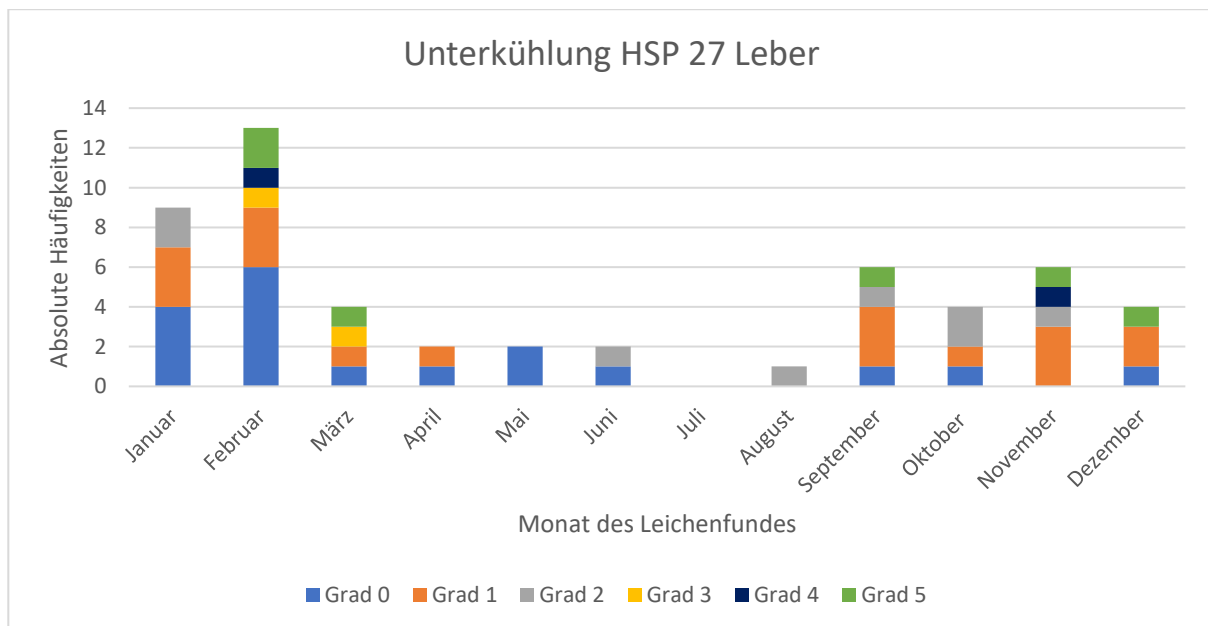
**Abb. 39:** Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 60 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Lebensalterintervalle zum Zeitpunkt des Versterbens.

Die Umgebung stellt ebenfalls einen wichtigen Faktor dar, da es einen direkten Effekt auf die Agoniedauer und damit das Vorliegen von HSP bewirkt. Ein Wärmeverlust tritt schneller in kaltem Wasser ein, als in kalter Luft mit der objektiv gleichen Temperatur. Bright et al. (2013) konnten ebenfalls nachweisen, dass mit steigender Agoniedauer vor Todeseintritt das Auftreten von HSP wahrscheinlicher ist. Da HSP 70 ein ATP-abhängig

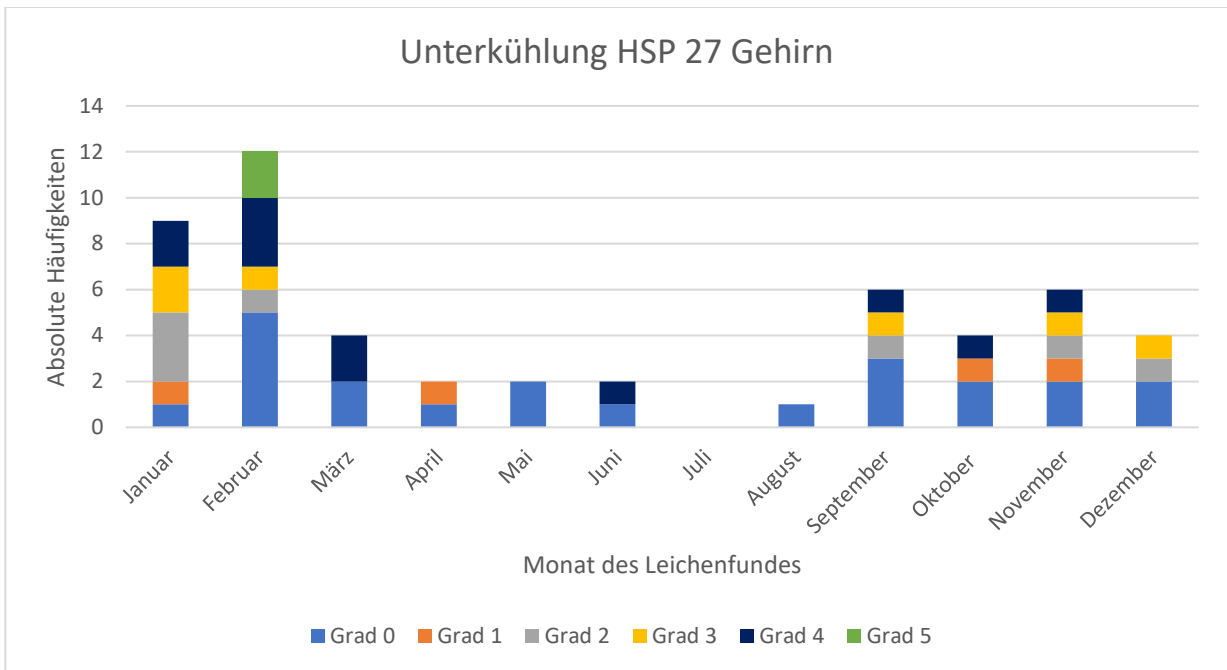
funktionierendes Enzym ist, ist es nach Ausbleiben der Bereitstellung von ATP postmortem aufgrund von Abbau bei fehlender Funktion nicht mehr nachweisbar. Wischnewski-Flecken hingegen treten erst nach einer gewissen Agoniedauer auf (Mizukami et al., 1999; Parsell und Lindquist, 1993; Schlesinger, 1990). In dieser Studie war die Gegenwart von Wischnewski Flecken das hauptsächliche Einschlusskriterium der Fälle in das Studienkollektiv als sicheres Zeichen der Hypothermie, sodass jeder Verstorbene dieser Gruppe einer gewissen Agoniedauer ausgesetzt gewesen sein muss. Das wiederum hatte ein Erschöpfen der Schutzmechanismen und der Energiebereitstellung des Organismus zur Folge, sodass die Synthese von ATP und HSP 70 sistierte und somit auch die bereits exprimierten HSP aufgrund der fehlenden Funktionstüchtigkeit denaturierten, was eine fehlende Nachweisbarkeit erklären kann. Dies kann allerdings nicht die Abwesenheit von HSP 70 im Kontrollkollektiv mit einer deutlich kürzeren postmortalen Liegezeit der Leiche und bei nahezu allen Fällen kurzer Agoniedauer (fast alle Tode ereigneten sich im Krankenhaus) erklären. Bright et al. (2013) konnten in einem Rattenmodell aufzeigen, dass Unterkühlung unter gleichzeitiger Wirkung einer Sedierung und Anästhesie zu keinerlei Stressreaktion des Körpers führt und daher auch nicht zum Anstieg von induzierbarem HSP. Zwei der Fälle aus der Unterkühlungsgruppe verstarben im Krankenhaus (Tabelle 1). Die genaueren Umstände der Tode im Krankenhaus konnten nicht weiter eruiert werden, also ob die Patienten des Studienkollektivs zum Zeitpunkt des Versterbens bereits narkotisiert waren oder wie lange sie vor Versterben im Krankenhaus behandelt worden sind, sodass nicht eindeutig gesagt werden kann, ob akuter Zellstress in den Fällen vorlag oder nicht. Die Betrachtung der postmortalen Liegezeit der Leiche bedingte ebenso keine signifikanten Unterschiede in den Färbegraden. Lediglich das Material, welches mit HSP 27 Antikörpern präpariert wurde, präsentierte diskret höhere Grade in den Fällen mit einer Liegezeit unter einem Tag hinweisend auf die Möglichkeit einer gesteigerten Expression kurze Zeit nach dem Tod, allerdings ohne nennenswerte Signifikanz. Eine weitere Betrachtung hinsichtlich des Auffindemonates und des Ortes, also ob die Leiche in einem geschlossenen Raum oder bei Außentemperatur im Freien gefunden wurde, lieferte wie zu erwarten eine merkliche Zunahme der Unterkühlungstode in den Wintermonaten (Abbildungen 40-42). In den Fällen von HSP 60 sowohl in Leber als auch in Gehirn ergaben sich keine merklichen Unterschiede in der Expression in Hinblick auf die einzelnen Wintermonate, wobei die



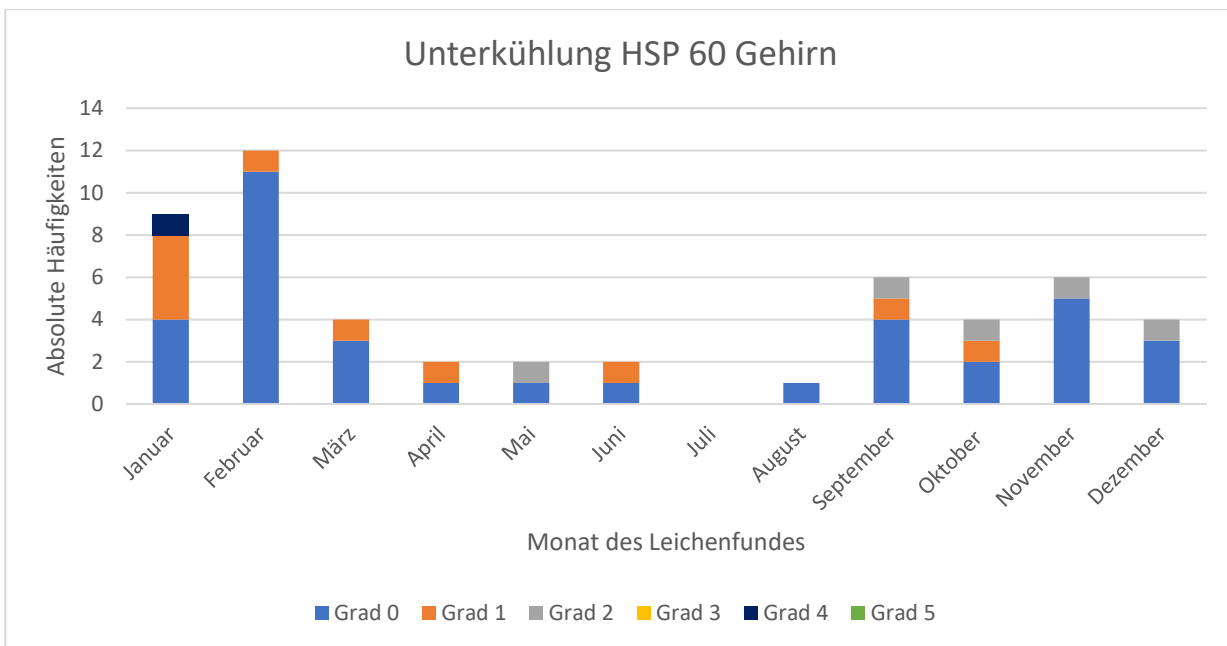
Menge positiver Färbungen insgesamt geringer ist. Bei HSP 27 zeigte sich im Verhältnis zur Gesamtmenge des jeweiligen Monats eine gesteigerte Expression in der Leber in den Monaten März und September bis Dezember. Auch die Färbegrade lagen in höheren Bereichen in den Wintermonaten. Die wenigen positiven Fälle in den Sommermonaten boten niedrigere Färbegrade. Dies passt zu den Erkenntnissen, dass die Umgebung die Unterkühlung allgemein beeinflusst (Madea et al., 2004; Mizukami et al., 1999). Es lagen zwar verhältnismäßig höhere Färbegrade in den Wintermonaten vor, allerdings war der Anteil der Todesfälle im Sommer sehr gering, sodass ein Vergleich beider Gruppen nicht sinnvoll ist. Die Betrachtung des Auffindeortes ergab in Hinblick auf HSP 60 keine Unterschiede aufgrund der geringen Anzahl positiver Proben (Abbildung 45). Hinsichtlich HSP 27 fand sich ein relativ höherer Anteil positiv gefärbter Präparate in den Fällen, welche bei Außentemperatur aufgefunden wurden. In der Leber waren die Färbegrade bei den in geschlossenen Räumen gefundenen Todesfällen höher, im Gehirn bestanden höhere Färbegrade in den draußen aufgefundenen Leichen (Abbildungen 43-44). Demnach lässt sich in dieser Studie kein einheitlicher Einfluss auf die Quantität exprimierter HSP anhand der Auffindemonate oder des Auffindeortes beschreiben, allerdings kann bestätigt werden, dass es mehr Unterkühlungstode in den Wintermonaten gibt.



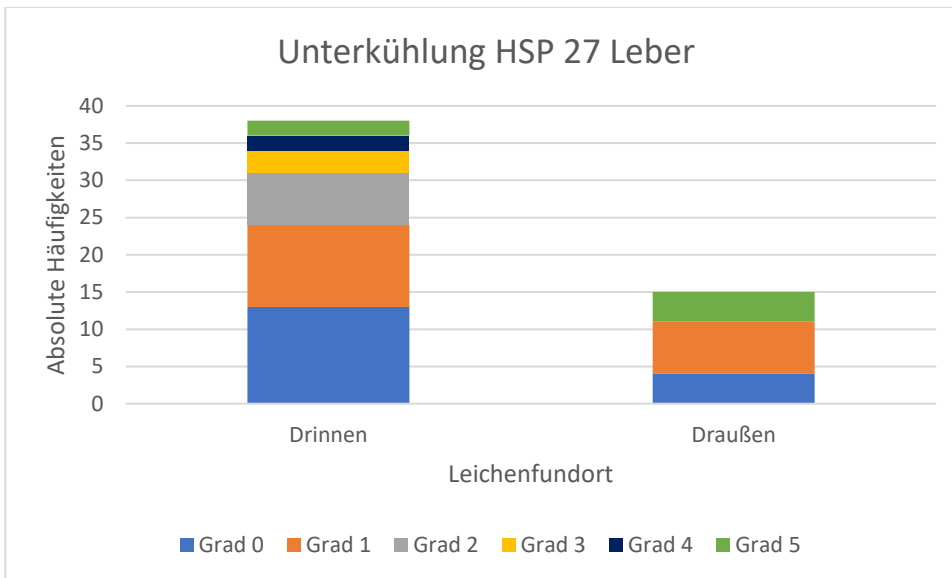
**Abb. 40:** Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 in der Leber des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Auffindemonate.



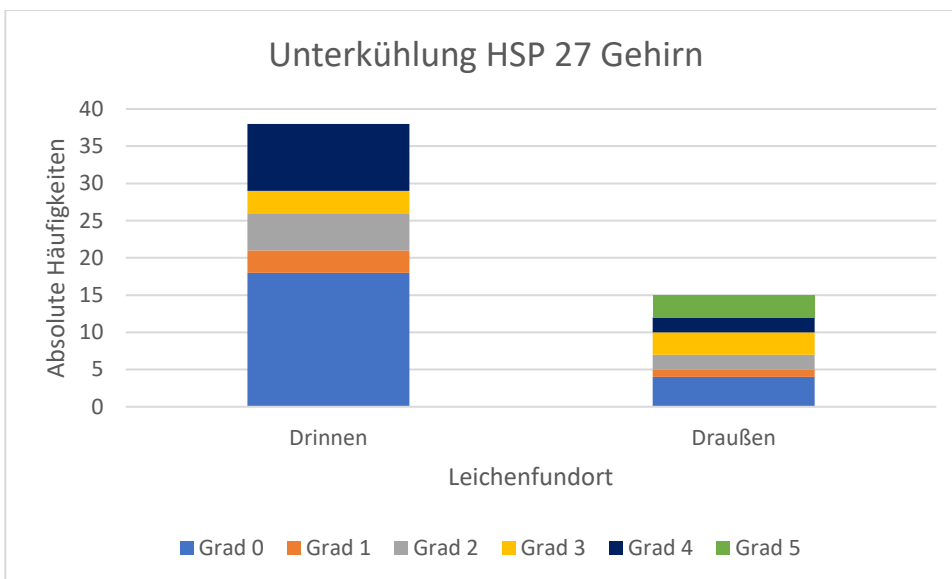
**Abb. 41:** Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Auffindemonate.



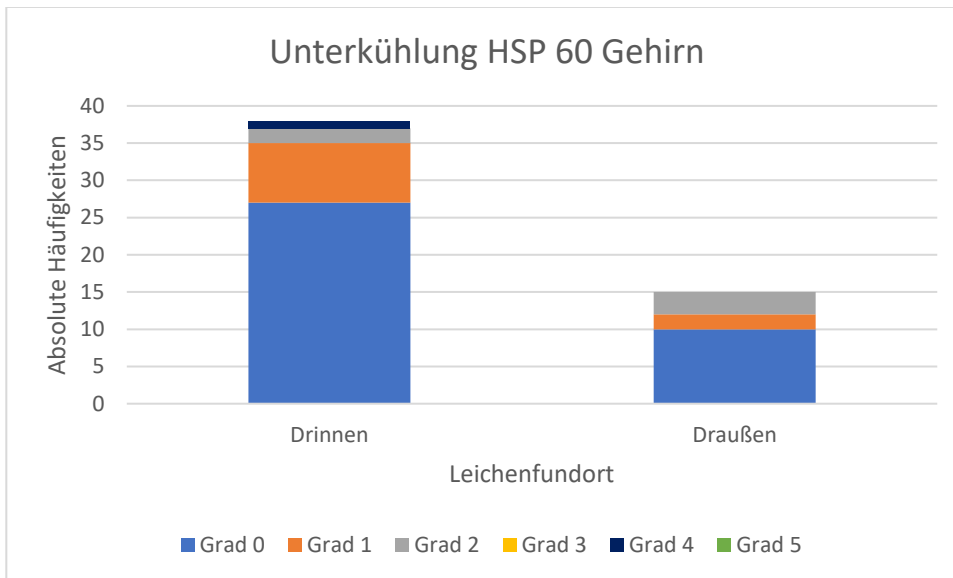
**Abb. 42:** Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 60 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Auffindemonate.



**Abb. 43:** Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 in der Leber des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit vom Auffindeort, also ob die Person in einem geschlossenen Raum (drinnen) oder außerhalb gefunden wurde (draußen).



**Abb. 44:** Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit vom Auffindeort, also ob die Person in einem geschlossenen Raum (drinnen) oder außerhalb gefunden wurde (draußen).



**Abb. 45:** Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 60 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit vom Auffindeort, also ob die Person in einem geschlossenen Raum (drinnen) oder außerhalb gefunden wurde (draußen).

HSP 60 in der Leber wird jeweils nicht dargestellt aufgrund der sehr geringen Anzahl positiv gefärbter Präparate und damit fehlender Relevanz für die Auswertung.

#### 4.3 Einfluss von Rauschmitteln

Die Blutalkohol-Konzentration ist ein weiterer Einflussfaktor auf die Agoniedauer und damit auch auf die Wahrscheinlichkeit, HSP in einer Zelle nachweisen zu können, welche kalten Temperaturen ausgesetzt war (Bright et al., 2013). Bisherige Studien lieferten verschiedene Ergebnisse bezüglich der Abhängigkeit mikroskopischer und makroskopischer Befunde und der analysierten Blutalkohol-Konzentration. Birchmeyer und Mitchell stellten die These auf, dass der Stress reduzierende Effekt von Alkohol zu einer verminderten Nachweisbarkeit spezifischer Merkmale im Leichnam führt, da der Organismus keine Stressreaktion anstößt und damit möglicherweise auch das Auftreten von HSP vermindert sein könnte (Birchmeyer, 1989). Dem gegenüber beschrieben Gserick et al. (2018) keine Korrelation zwischen Alkoholkonzentration und morphologischen Zeichen des Todes durch Unterkühlung. In dieser Studie war kein Zusammenhang zwischen gemessener Alkoholkonzentration im Blut und dem Auftreten von HSP festzustellen. Dies kann aber auch durch die agonale Verminderung der

Alkoholkonzentration und den unterschiedlich langen Liegezeiten der untersuchten Leichen begründet sein (Türk et al., 2005). Außerdem beschrieben Birchmeyer (1989) sowie Geserick et al. (2018) in ihren Arbeiten jeweils das Vorliegen makro- und mikroskopischer Befunde, führten aber keine immunhistochemischen Analysen durch, sodass eine Vergleichbarkeit mit dieser Arbeit limitiert ist.

#### 4.4 Einfluss kardialer Schädigung

Es wurde in der Arbeit auch ein möglicher Zusammenhang zwischen antemortem bekannter kardialer Vorbelastung oder verdächtigen Befunden in den Obduktionsprotokollen hinsichtlich kardialer Erkrankungen und positiven mikroskopischen Resultaten mit Nachweis von HSP berücksichtigt. Vorschädigungen des Herzens beschleunigen den Prozess des Todeseintrittes in kalter Umgebung, weil die Herzleistung insgesamt leichter dekompensiert und daher die Agoniedauer verkürzt wird (Ryti et al., 2018; Valtonen et al., 2018). Diese Studie zeigte, dass eine kardiale Vorbelastung die Synthese oder, im Gegenteil, supprimierte Expression der HSP nicht signifikant verstärken, am ehesten aufgrund der verschiedenen bekannten Faktoren, die die Zellstress- und Selbstschutz-Mechanismen des Organismus aktivieren können (Currie et al., 2000; Feder, 1999; Mizukami et al., 1999; Ritossa, 1996; Parsell und Lindquist, 1993; Samali und Orrenius, 1998). Andererseits fiel in dieser Studie auf, dass im Hirngewebe der Studiengruppe mehrere Fälle stärkere Färbegrade von HSP 27 in Kombination mit Hypothermie und bekannter kardialer Vorbelastung aufwiesen. Dies könnte eine Reaktion auf mehrere Stressoren als lediglich die Kälte sein, denen die Zellen ausgesetzt waren. Letztlich kann nicht eindeutig geklärt werden, ob diese verstärkte Reaktion auf die Temperatur oder auf die kardiale Vorbelastung zurückzuführen ist. In Hinblick auf die sich kaum unterscheidenden Färbintensitäten in den Kontrollgruppen kann angenommen werden, dass ein Auftreten von mehreren Stressoren zu einer gesteigerten HSP Expression führt. In dieser Studie wurde das Augenmerk allerdings auf den Einfluss kalter Temperatur auf einen Zelltyp bzw. ein Organ gelegt. Unterkühlung ließ sich aber nicht verlässlich als alleiniger Faktor, der zu einer Steigerung der HSP Synthese führt, differenzieren.

## 4.5 Expression von HSP 27

### 4.5.1 Expression HSP 27 in der Leber

Nach statistischer Auswertung fand sich keine signifikant höhere Expression von HSP 27 im Lebergewebe von Unterkühlungspräparaten im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Abbildungen 18, 24). In der ursprünglichen These, dass Hypothermie maßgeblich zu einem gesteigerten Vorliegen von HSP beiträgt, muss die Expression durch multiple Einflüsse berücksichtigt werden, welche in der hiesigen Studie nicht alle betrachtet werden konnten. Daher erfolgte die Auswertung auch hinsichtlich der häufigsten konkurrierenden Parameter und wie sie das Auftreten von HSP verändern konnten. Hier konnte allerdings keine eindeutige Aussage zu begünstigenden Einflüssen der HSP 27 Expression in der Leber getroffen werden, wobei jeder einzelne Einflussfaktor für sich genommen bereits die gesteigerte Synthese von Heat Shock Proteinen begünstigt. Es kann also nicht geschlussfolgert werden, dass Hypothermie ein alleiniger Faktor beim Auftreten von HSP 27 ist. Wie stark eine Hypothermie ins Gewicht fällt bei der Expression im Vergleich zu anderen Faktoren wie Vorerkrankungen, Intoxikation oder Liegedauer, war nicht Gegenstand dieser Arbeit und bedarf zur Klärung weiterer ausgedehnter Studien.

### 4.5.2 Färbegrade HSP 27 in der Leber

Die Betrachtung der Färbegrade ergab eine gesteigerte Färbeintensität im Falle von Kälteeinfluss (Abbildungen 21-23). Insbesondere in Kombination mit konkurrierenden Einflussfaktoren (kardialer Vorerkrankung, Rauschmittelintoxikation und Liegezeit < 1 Tag) ergab sich im Studienkollektiv ein gesteigerter Färbegrad, auch im Vergleich mit dem Studienkollektiv ohne vorliegende konkurrierende Faktoren. Damit lässt sich zusammenfassen, dass eine Summe aus mehreren HSP-Synthese triggernden Komponenten zu einer gesteigerten Expression führt. Da dies in der Kontrollgruppe nicht in der Form zu beobachten war, kann geschlussfolgert werden, dass Unterkühlung bei bereits vorliegenden Risikofaktoren zu einer Steigerung der HSP-Expression beiträgt. Hinsichtlich der höheren Färbegrade bei einer Liegezeit von unter einem Tag lässt sich postulieren, dass mit fortschreitendem Aabbauprozess postmortem auch der Zerfall von HSP eintritt und damit die diagnostische Wertigkeit in Hinblick auf eine Unterkühlung

gesenkt wird (Elmore, 2007; Kurosaka et al., 2003; Majno und Joris, 1995; Pfeifer et al., 2008).

#### 4.5.3 Expression HSP 27 im Gehirn

Die Untersuchung und anschließende statistische Auswertung des Nachweises von HSP 27 im Gehirn lieferte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Vorliegens von HSP 27 im Unterkühlungskollektiv verglichen mit den Kontrollen (Abbildungen 19, 24). Es fand sich hauptsächlich HSP 27 in arteriellen Gefäßwänden, was mit den Befunden der Studien von Sharp et al. (2000) korreliert. Er beschrieb eine gesteigerte Expression von HSP 27 unter Stressbedingungen vor allem in Astrozyten sowie in Endothelzellen und mikrovaskulären Zellen des Gehirns. Es ist davon auszugehen, dass durch die vorliegende Stressreaktion im Rahmen der Unterkühlung der Organismus bestrebt ist, die Energieversorgung der Neuronen so lange wie möglich aufrecht zu erhalten und damit das Nervengewebe vor dem drohenden Untergang zu schützen, was unter anderem durch die Induktion von HSP 27 und damit Einflussnahme auf die Apoptose geschieht. Allerdings nehmen zu viele verschiedene Faktoren Einfluss auf die Synthese von HSP, sodass hier nicht auf einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der generellen Expression und einem Unterkühlungstod geschlossen werden kann (Feder, 1999; Lanneau et al., 2008; Parsell und Lindquist, 1993; Sarto et al., 2000).

#### 4.5.4 Färbegrade HSP 27 im Gehirn

Was in dieser Studie aufgezeigt werden konnte, waren höhere Färbegrade von HSP 27 im Studienkollektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildungen 25-27). Insbesondere das Hirngewebe bot intensivere Färberesultate nach Einfluss kalter Temperaturen vor Todeseintritt. Damit könnte davon ausgegangen werden, dass Hypothermie bereits zu einer gesteigerten HSP-Synthese führt. Allerdings war ebenso eine Korrelation zwischen höheren Färbegraden von HSP 27 und zusätzlich vorliegender kardialer Vorbelastung antemortem in Kombination mit Hypothermie festzustellen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Latchman, der ebenfalls insbesondere eine gesteigerte Menge an Heat Shock Proteinen aufgrund von kardialer Ischämie o.ä. beobachtet hatte. Im Mausmodell konnte sowohl im ZNS als auch in Kardiomyozyten eine gesteigerte, durch ischämische Einflüsse stressbedingte Synthese von HSP 27 nachgewiesen werden (Latchman, 2005).

Somit war keine Aussage darüber möglich, ob die stark positive Färbereaktion einen spezifischen Effekt des Kälteeinflusses darstellte oder durch den gleichzeitig vorliegenden kardialen Stress beeinflusst wurde. Außerdem bestanden gesteigerte Färbegrade in der Gruppe mit einer postmortalen Liegezeit von unter 1 Tag. Passend zu den Daten von Currie et al. (2000) sowie Mehlen et al. (1995) und Sharp et al. (2013) ist davon auszugehen, dass eine nicht allzu verzögerte postmortale Untersuchung von Gewebe auf Heat Shock Proteine hilft, ein valides Ergebnis zu erhalten. Unterschiedliche Arten von HSP werden verschieden schnell nach Eintreten einer Stressreaktion und unterschiedlich lange bei andauerndem Stress exprimiert und sind daher nicht einheitlich nachweisbar. Durch die postmortalen Abbauprozesse im Körper kommt es zu einer Zerstörung der Enzyme und Strukturen und somit auch einem im Verlauf geringeren Vorliegen von HSP, da keine weiteren synthetisiert werden können.

#### 4.6 Expression von HSP 60

##### 4.6.1 Expression von HSP 60 in der Leber

Im Falle der Betrachtung von HSP 60 fiel sogar eine signifikant geringere Expression im Lebergewebe im Unterkühlungskollektiv auf (Abbildungen 28, 30), was darauf schließen lassen könnte, dass hypotherme Bedingungen zu einer Suppression der HSP-Expression führen kann. Vargas-Parada et al. (2001b) untersuchten die Expression verschiedener HSP unter anderem auch mit Inkubation bei 4°C und kamen zu der Annahme einer „Kälteschock-Antwort“, da insbesondere HSP 80, aber auch HSP mit geringerem Molekulargewicht synthetisiert worden sind. Allerdings wurden die Untersuchungen nicht in humanem Lebergewebe, sondern in *Taenia crassiceps*, also einer Bandwurmspezies, durchgeführt, was alleine zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Parcell und Lindquist (1993) sowie Parcellier et al. (2003) haben sich die Veränderungen bei hohen Temperaturextremen angeschaut, die Untersuchung des Einflusses niedriger Temperaturen fehlt, sodass lediglich festgehalten wurde, dass eine Temperatursteigerung zu einer HSP Induktion führt. Nach dem Ergebnis dieser Arbeit ist im Gegensatz zu Vargas-Parada et al. (2001b) allerdings davon auszugehen, dass Unterkühlung nicht zu einer gesteigerten Expression von HSP 60 beiträgt oder dass anderweitige Faktoren



vorgelegen haben, welche auf die Synthese oder den Abbau der HSP zusätzlich Einfluss genommen haben. Es ist möglich, dass kalte Temperaturen einen weniger potenten Induktor der HSP-Aktivität darstellen als andere untersuchte Faktoren, wie Hitze, oxidativer Stress oder Ischämien, wobei die längere Expositionsdauer bis zum Eintreten einer vitalen Gefährdung im Gegensatz zur akuten Verbrennung oder Ischämie und damit konstante Schädigung des Gewebes dem eigentlich widerspricht. Zudem ist die Aussagekraft der verglichenen Proben stark beeinträchtigt, da lediglich 2 Proben im Unterkühlungskollektiv und 9 im Kontrollkollektiv positive Färbungen aufwiesen. Da auch HSP 60 ATP-abhängig arbeitet (Hartl, 1996; Parsell und Lindquist, 1993), ist es möglich, dass aufgrund der teils verzögerten postmortalen Untersuchung der Gewebe die HSP nur noch eingeschränkt nachweisbar waren. Hierfür spricht, dass im Kontrollkollektiv mit einer signifikant kürzeren postmortalen Liegezeit im Vergleich zum Studienkollektiv (Abbildung 17) auch die Nachweisbarkeit von HSP 60 im Vergleich zum Studienkollektiv gesteigert war. Eine detaillierte Betrachtung der Einflussfaktoren ist in Anbetracht der kleinen Stichprobengröße der positiven Fälle nicht möglich (Abbildungen 30-32).

#### 4.6.2 Färbegrade HSP 60 in der Leber

Die Analyse der Färbegrade ist hinsichtlich der geringen Anzahl an Proben mit nachgewiesenem HSP nicht zielführend (Abbildungen 30-32).

#### 4.6.3 Expression von HSP 60 im Gehirn

Bei der Analyse von HSP 60 im Gehirn ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Unterkühlungs- und dem Kontrollkollektiv (Abbildungen 29, 33). Ebenso bestanden keine signifikanten Unterschiede bei Betrachtung der möglichen Einflussfaktoren auf die HSP-Expression (Abbildungen 34-36). Wie bereits von Leak et al. (2013) und Ranford et al. (2000) beschrieben waren auch in dieser Arbeit hauptsächlich Endothelzellen bzw. an Blutgefäße angrenzende Zellen im zentralen Nervensystem, also Astrozyten, angefärbt. Aufgrund des vermehrten Vorliegens von HSP in diesen Zellen des zentralen Nervensystems lässt sich, wie unter 1.3 und 1.3.1 bereits beschrieben, auf eine vorliegende Stressreaktion des Körpers schließen. Anhand der vorliegenden Daten scheint diese aber unabhängig eines bestimmten Stressfaktors abgelaufen zu sein, da sich keine individuelle Ursache für die Expression eruieren ließ. Weder Hypothermie noch

sonstige Einflüsse wie kardiale Belastung oder Intoxikation lieferten eindeutige Hinweise auf eine spezifisch gesteigerte HSP 60 Expression im Hirngewebe (Abbildungen 35, 36). Somit ist zu postulieren, dass HSP 60 sich weder in der Leber noch im Gehirn als diagnostischer Marker für eine vorliegende Unterkühlung als Todesursache eignet.

#### 4.6.4 Färbegrade HSP 60 im Gehirn

Auch die Betrachtung der Färbegrade trotz der eher geringen Probengröße mit positivem HSP 60 Nachweis lieferte keine maßgeblichen Unterschiede, weder im Vergleich mit der Kontrollgruppe noch bei Betrachtung der konkurrierenden Einflussfaktoren, sodass die zuvor getroffene Aussage hinsichtlich der fehlenden Eignung von HSP 60 als diagnostischer Marker bestehen bleibt (Abbildungen 33-36).

#### 4.7 Limitationen

Die Anzahl der Fälle mit ergänzenden Einflussfaktoren wie Blutalkohol und kardialer Vorbelastung unterschied sich merklich von der Anzahl der Fälle ohne diese zusätzlichen Merkmale, sodass ein Vergleich der beiden Gruppen nur limitiert möglich ist. Eine mögliche Hypothese für die höheren Färbegrade in einigen Fällen mit Alkohol- oder Drogenintoxikation und kardialer Vorbelastung ist, dass in diesen Individuen aufgrund des kontinuierlichen Stresses physiologischerweise eine erhöhte Grundkonzentration von HSP nachzuweisen ist. Wenn nun Kälte als zusätzlicher Stressor hinzukommt, steigt das bereits von vornherein höhere Level von HSP noch weiter an (Hendrick und Hartl, 1993; Parsell und Lindquist, 1993; Schlesinger, 1990). Die postmortalen Liegezeiten scheinen ebenfalls das Vorliegen von HSP zu beeinflussen. Wie von Currie et al. (2000) beschrieben, sind HSP unterschiedlich lange nach Stress nachweisbar, HSP 70 1-4 Tage und HSP 27 je nach Umständen bis zu 4 Wochen. Somit ist davon auszugehen, dass bereits durch die verschiedenen Intervalle bis zur Untersuchung postmortem, bedingt durch die nicht einheitlichen Liegezeiten zwischen wenigen Stunden und mehreren Wochen, eine unterschiedliche Anzahl an HSP zustande gekommen ist. Ursächlich dafür zeigen sich die postmortalen Abbauprozesse, sodass eine möglichst zeitnahe und in der Zeit einheitliche Untersuchung des Gewebes auf Enzyme diesen Störfaktor minimieren könnte. Eine einheitliche postmortale Liegezeit ist nahezu unmöglich zu gewährleisten,

da die Leichenauffindung einen nicht beeinflussbaren Faktor darstellt. Da allerdings eine Probenentnahme erst während der Obduktion möglich ist und ebenso eine Fixierung der Gewebe, lässt sich das Intervall zwischen Auffinden der Leiche bis zur Aufarbeitung und Untersuchung der einzelnen Proben in der Praxis unmöglich vereinheitlichen. Zudem ist eine möglichst zeitnahe rechtsmedizinische Untersuchung des Leichnams und damit einhergehende Probenentnahme sowie die histologische Aufarbeitung zur Untersuchung auf HSP und damit Erhalt eines validen Ergebnisses wie von Currie et al. (2000), Mehlen et al. (1995) und Sharp et al. (2013) beschrieben im rechtsmedizinischen Alltag nahezu nicht möglich. Gründe hierfür sind am ehesten logistischer Natur, wie z.B. das Zeitintervall von Finden einer Leiche über Spurensicherung, Transport in ein rechtsmedizinisches Institut und letztendlich Beginn einer Obduktion und damit der Gewebeentnahme. Darüber hinaus tragen die konkurrierenden Einflüsse auch dazu bei, dass die induzierbaren HSP vermehrt synthetisiert werden und damit multifaktorieller Genese in gesteigerter Konzentration vorliegen. Damit wird die Aussagekraft dieser Arbeit in Hinblick auf die Fragestellung der HSP-Expression durch Hypothermie maßgeblich gesenkt. Dienlich wäre ein Studiensetting gewesen, in welchem die Einflussfaktoren vollständig eliminiert oder, wie im Falle der Liegezeiten, einheitlich gewählt worden wären, sodass lediglich die HSP-Expression im Rahmen einer Unterkühlung zu betrachten wäre. In der Praxis ist die Gewährleistung solcher Bedingungen allerdings nicht realisierbar, da allein die Unterkühlung als Todesursache durch verschiedene Komorbiditäten begünstigt werden kann und damit überproportional häufig in Kombination mit solchen anzutreffen ist. Ein Kollektiv mit ausschließlich Unterkühlungsnachweis ohne das Vorliegen konkurrierender Faktoren hätte eine nicht mehr repräsentative, geringe Fallzahl im Studienkollektiv zur Folge gehabt. Zudem ist die Aussagekraft aufgrund der semiquantitativen Auswertung gesenkt, da die Gesichtsfelder untersucherabhängig gesetzt wurden, auch wenn das gesamte Präparat betrachtet und alle positiv gefärbten Felder gezählt worden sind. Damit liefert die Auszählung ein möglichst genaues Ergebnis, aber bildet dennoch eine Annäherung.

## 5. Zusammenfassung

Unterkühlung stellt bislang eine Diagnose dar, welche in Zusammenschau aus bekannter Anamnese, Auffindesituation, makroskopischen und mikroskopischen Befunden während der Autopsie und nach Ausschluss konkurrierender Ursachen gestellt wird. Da Kälteeinfluss einen starken Stressor für den Organismus darstellt, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Bedeutung von Heat Shock Proteinen in Hinblick auf die Diagnosestellung einer letalen Hypothermie. Bei HSP handelt es sich um Chaperone, die physiologischerweise im Organsystem exprimiert werden, was durch verschiedene Einflüsse weiter induzierbar ist. Die Aufgabe im zellulären System ist die Protektion von Proteinen und damit die Vermeidung des Zelltodes.

In dieser Studie wurden Gehirn- und Lebergewebe einer repräsentativen Anzahl von Unterkühlungsfällen mit einer entsprechenden Kontrollgruppe verglichen. Das Durchschnittsalter der jeweiligen Gruppen unterschied sich nicht merklich, es fanden sich lediglich ausgeprägte Unterschiede in der Liegezeit, also der Zeit von Todeseintritt bis Auffinden der Leiche. Zudem wurden kardiale Vorbelastung und Intoxikation als weitere Einflussfaktoren berücksichtigt, welche ausgesucht wurden nach Auswertung der häufigsten Todesursachen in der Kontrollgruppe und damit möglicher konkurrierender Faktoren der HSP-Expression.

Die Proben wurden immunhistochemisch aufgearbeitet und HSP 27, 60 und 70 mittels Avidin-Biotin-Komplex-Methode in den Organen angefärbt. Anschließend erfolgte eine lichtmikroskopische Auswertung mit Hilfe von über die Präparate gesetzte Gesichtsfelder, welche miteinander verglichen und prozentual ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden zur Beurteilung der Quantität der angefärbten Anteile des Organschnittes und zur Vergleichbarkeit der Gruppen graduiert.

HSP 70 musste aus den Berechnungen ausgeschlossen werden, da es keine positiven Färbungen unter den untersuchten Präparaten gab. Es konnte keine signifikante Häufigkeit oder Unterschiede in der Graduierung von HSP 27 in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektives im Vergleich zum Kontrollkollektiv festgestellt werden. Hingegen fand sich in den Gehirn-Proben bei Betrachtung von HSP 27 zwar keine Signifikanz in der

Anfärbarkeit an sich, die Graduierung lieferte allerdings höhere Färbegrade im Vorliegen der Chaperone unter Kälteeinfluss. Es musste aber eine Korrelation zwischen einer hohen Graduierung und dem Vorliegen von kardialen Erkrankungen berücksichtigt werden. Die Betrachtung von HSP 60 lieferte keine kausalen Zusammenhänge zwischen Unterkühlung und Chaperon-Synthese, ebenso die Graduierungen unterschieden sich nicht merklich.

Aufgrund der vielen verschiedenen Einflussfaktoren auf die Steigerung der Synthese von HSP konnte Unterkühlung in dieser Studie nicht als signifikanter Faktor herausgearbeitet werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass Kälte zur verstärkten Expression von HSP beiträgt, es aber multiple konkurrierende Faktoren gibt, welche eliminiert werden müssten, bevor man auf Unterkühlung allein als Ursache schließen kann. Daher können die hier untersuchten Proteine lediglich als unterstützend bei der Diagnose einer letalen Hypothermie eingesetzt werden, eine Diagnosestellung ist allerdings nicht möglich.

## 6. Anhang

### Materialzusammenstellung der Versuche

#### **Target Retrieval Solution, Citrat pH6 (DAKO)**

Code: S2369

10faches Konzentrat, Verdünnung 1:10 in Aqua demineralisata

#### **TBST Tris Buffered Saline with Tween 20 (DAKO)**

Code: S3306

10faches Konzentrat, Verdünnung 1:10 Aqua demineralisata

#### **Swine Serum (DAKO)**

Code: X0901

Undiluted normal swine ser from clinically healthy swine (sodium azide [NaN<sub>3</sub>] added to concentration of 15 mmol/L)

Verdünnung 1:5 in Tris Puffer (s.o.)

#### **Antibody Diluent (DAKO ChemMate™)**

Code: S2022

Tris buffer pH 7,2, 15mmol/L NaN<sub>3</sub> & protein

#### **Novocastra - Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Heat Shock Protein 27 (Leica Biosystems)**

Code: NCL – HSP27

Target: Human HSP 27 (Specificity)

Overrunning 1:20 in Antibody Diluent (s.o.)

#### **Novocastra – Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Heat Shock Protein 70 (Leica Biosystems)**

Code: NCL – HSP70

Target: Human HSP 70/Hsc70 & reactive with HSP 70/Hsc70 mouse & rat (Specificity)

Verdünnung 1:25 in Antibody Diluent (s.o.)

**Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 60 antibody produced in mouse (SIGMA-ALDRICH)**

Code: H4149

Target: human HSP 60 (Specificity)

Verdünnung 1:800 in Antibody Diluent (s.o.)

**Peroxidase-Blocking-Solution (DAKO ChemMate™)**

Code: S2023

Hydrogen peroxide solution

**LSAB2-System-HRP (DAKO)**

Code: K0675

1. Biotinylated Link = goat anti-mouse & anti-rabbit antibody in PBS + stabilizing protein & sodium azide
2. Streptavidin-HRP = conjugated to horseradish peroxidase in PBS + stabilizing protein & anti-microbial agents

**AEC-Substrate Chromogene (DAKO)**

Code: K3464

For in peroxidase-based immunohistochemical & in situ hybridization; red end-product 0,75mg/ml 3-Amino-9-Ethylcarbazole in 2,5 % N,N-dimethylformamide & 0,05mol/L acetate buffer, pH 5.0 containing hydrogen peroxide, stabilizers, enhancers & anti-microbial agents

**Faramount Aequous Mounting Medium (DAKO)**

Code: S3025

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der zellulären Apoptose, möglich ist die Einleitung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges mit Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden. Beide Wege münden in der gleichen Endstrecke. Entnommen aus: „Mathematical modeling of apoptosis“ von Schleich und Lavrik (2013)

Abbildung 2: Säulendiagramm-Darstellung der Todesursachen in der Kontrollgruppe (44 Fälle) auf der X-Achse entnommen aus Obduktionsbefunden sowie deren Häufigkeit in absoluten Zahlen auf der Y-Achse (Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn)

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzipes der Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Abbildung 4: Epidermis; Positiv-Kontrolle der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von HSP 70; Lichtmikroskop 100fache Vergrößerung

Abbildung 5: Epidermis; Positiv-Kontrolle der Immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von HSP 27; Lichtmikroskop 100fache Vergrößerung

Abbildung 6: Niere; Positiv-Kontrolle der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von HSP 60; Lichtmikroskop 100fache Vergrößerung

Abbildung 7: Gehirn; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 27; Lichtmikroskop 100fache Vergrößerung

Abbildung 8: Gehirn; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 27; Lichtmikroskop 200fache Vergrößerung

Abbildung 9: Leber; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 27; Lichtmikroskop 100fache Vergrößerung

Abbildung 10: Leber; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 27; Lichtmikroskop 200fache Vergrößerung

Abbildung 11: Gehirn; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 60; Lichtmikroskop 200fache Vergrößerung



Abbildung 12: Gehirn; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 60; Lichtmikroskop 400fache Vergrößerung

Abbildung 13: Leber; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 60; Lichtmikroskop 200fache Vergrößerung

Abbildung 14: Leber; Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von HSP 60; Lichtmikroskop 400fache Vergrößerung

Abbildung 15: Betrachtung des Vorliegens des potenziellen Einflussfaktors Alkohol- und/oder Drogenkonsum, anamnestisch oder toxikologisch nachgewiesen, im Vergleich zwischen Studienkollektiv (Unterkühlung) und der Kontrollgruppe (Kontrolle) in relativen Zahlen.

Abbildung 16: Betrachtung des Vorliegens des potenziellen Einflussfaktors der kardialen Vorbelastung, anamnestisch oder anhand der Obduktionsbefunde nachgewiesen, im Vergleich zwischen Studienkollektiv (Unterkühlung) und der Kontrollgruppe (Kontrolle) in relativen Zahlen.

Abbildung 17: Vergleich der postmortalen Liegezeiten zwischen Studienkollektiv (Unterkühlung) und Kontrollgruppe (Kontrolle) nach Einteilung der Zeiten in Intervalle  $> 1$  Tag und  $< 1$  Tag in relativen Zahlen.

Abbildung 18: Vergleich zwischen Unterkühlungs- und Kontrollgruppe der Lebergewebsproben nach Anfärbung von HSP 27 auf der X-Achse; Prozentualer Anteil der positiven Färbung in einer Probe, Verteilung aller Einzelproben auf der y-Achse; Unterkühlung  $n= 53$ , Kontrollgruppe  $n= 44$ . Darstellung von Streuung, Median ( $M_{UK} = 11,11$ ;  $M_{Ktl} = 6,25$ ), 75%-Perzentile ( $Q_{3(UK)} = 30,13$ ;  $Q_{3(Ktl)} = 15,47$ ).  $p=0,1095$

Abbildung 19: Vergleich zwischen Unterkühlungs- und Kontrollgruppe der Gehirngewebsproben nach Anfärbung von HSP 27 auf der X-Achse; Prozentualer Anteil der positiven Färbung in einer Probe, Verteilung aller Einzelproben auf der y-Achse; Unterkühlung  $n= 53$ , Kontrollgruppe  $n= 44$ . Darstellung von Streuung, Median ( $M_{UK} = 21,43$ ;  $M_{Ktl} = 8,69$ ), 75%-Perzentile ( $Q_{3(UK)} = 62,92$ ;  $Q_{3(Ktl)} = 18,66$ ).  $p=0,0634$

Abbildung 20: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektivs und des Kontrollkollektivs im relativen Vergleich

Abbildung 21: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich

Abbildung 22: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Leberpräparaten des Kontrollkollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich

Abbildung 23: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektivs mit einer Leichenliegezeit über einem Tag also 24 Stunden (> 1 Tag) und unter einem Tag (< 1 Tag) im relativen Vergleich

Abbildung 24: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs und des Kontrollkollektivs im relativen Vergleich

Abbildung 25: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich

Abbildung 26: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Gehirnpräparaten des Kontrollkollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich

Abbildung 27: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 27 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs mit einer Leichenliegezeit über einem Tag also 24 Stunden (> 1 Tag) und unter einem Tag (< 1 Tag) im relativen Vergleich

Abbildung 28: Vergleich zwischen Unterkühlungs- und Kontrollgruppe der Lebergewebsproben nach Anfärbung von HSP 60 auf der X-Achse; Prozentualer Anteil der positiven Färbung in einer Probe, Verteilung aller Einzelproben auf der y-Achse; Unterkühlung n= 53, Kontrollgruppe n= 44. Darstellung von Streuung, Median ( $M_{UK} = 0$ ;  $M_{Ktl} = 0$ ), 75%-Perzentile ( $Q_{3(UK)} = 0$ ;  $Q_{3(Ktl)} = 0$ ).  $p=0,0045$

Abbildung 29: Vergleich zwischen Unterkühlungs- und Kontrollgruppe der Gehirngewebsproben nach Anfärbung von HSP 60 auf der X-Achse; Prozentualer Anteil der positiven Färbung in einer Probe, Verteilung aller Einzelproben auf der y-Achse; Unterkühlung n= 53, Kontrollgruppe n= 44. Darstellung von Streuung, Median ( $M_{UK} = 0$ ;  $M_{Ktl} = 0$ ), 75%-Perzentile ( $Q_{3(UK)} = 7,85$ ;  $Q_{3(Ktl)} = 14,44$ ).  $p=0,4800$

Abbildung 30: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektivs und des Kontrollkollektivs im relativen Vergleich

Abbildung 31: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Leberpräparaten des Unterkühlungskollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich

Abbildung 32: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Leberpräparaten des Kontrollkollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich

Abbildung 33: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs und des Kontrollkollektivs im relativen Vergleich

Abbildung 34: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich

Abbildung 35: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Gehirnpräparaten des Unterkühlungskollektivs mit einer Leichenliegezeit über einem Tag also 24 Stunden (> 1 Tag) und unter einem Tag (< 1 Tag) im relativen Vergleich

Abbildung 36: Graphische Darstellung der Graduierungen (0-5) der HSP 60 Färbung in Gehirnpräparaten des Kontrollkollektivs ohne Einflussfaktoren (KEINE), mit Intoxikationsnachweis (INTOX) und mit begleitender kardialer Vorbelastung (KAR) im relativen Vergleich

Abbildung 37: Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 in der Leber des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Lebensalterintervalle zum Zeitpunkt des Versterbens.

Abbildung 38: Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Lebensalterintervalle zum Zeitpunkt des Versterbens.

Abbildung 39: Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 60 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Lebensalterintervalle zum Zeitpunkt des Versterbens.

Abbildung 40: Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 in der Leber des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Auffindemonate.

Abbildung 41: Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Auffindemonate.

Abbildung 42: Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 60 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit verschiedener Auffindemonate.

Abbildung 43: Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 in der Leber des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit vom Auffindeort, also ob die Person in einem geschlossenen Raum (drinnen) oder außerhalb gefunden wurde (draußen).

Abbildung 44: Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 27 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit vom Auffindeort, also ob die Person in einem geschlossenen Raum (drinnen) oder außerhalb gefunden wurde (draußen).

Abbildung 45: Graphische Darstellung der Verteilung der unterschiedlichen Färbegrade in Absolutzahlen von HSP 60 im Gehirn des Unterkühlungskollektivs in Abhängigkeit vom Auffindeort, also ob die Person in einem geschlossenen Raum (drinnen) oder außerhalb gefunden wurde (draußen).

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung der Merkmale des Unterkühlungskollektivs (Geschlecht, Alter, Auffindeort und -monat, bekannte kardiale Belastung, Intoxikation mit Alkohol oder Drogen, Liegezeit), Zusammengetragen aus Obduktionsprotokollen des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Bonn

Tabelle 2: Zusammenstellung der Merkmale des Kontrollkollektivs dieser Arbeit (Geschlecht, Alter, Auffindeort, bekannte kardiale Belastung, Intoxikation mit Alkohol oder Drogen, Liegezeit, Todesursache), Zusammengetragen aus Obduktionsprotokollen des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Bonn

Tabelle 3: Graduierung der immunhistochemisch positiv gefärbten Organschnitte. Einschätzung der roten Felder zum gesamten Präparat in Prozent.

Tabelle 4: Übersichtstabellen der immunhistochemischen Untersuchungen von HSP 27 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs mit Angabe der absoluten Zahlen positiver und negativer Färbeergergebnisse.

Tabelle 5: Auflistung der Färbeergergebnisse (Positiv und Negativ) von HSP 27 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs in absoluten Zahlen in Hinblick auf die Einflussfaktoren „Kardiale Vorbelastung“, „Intoxikation“ (mit Alkohol oder anderweitigen Substanzen s.o.).

Tabelle 6: Auflistung der Färbeergergebnisse (Positiv und Negativ) von HSP 27 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs in absoluten Zahlen in Hinblick auf den Einflussfaktor „Liegezeit“.

Tabelle 7: Übersichtstabellen der immunhistochemischen Untersuchungen von HSP 60 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs mit Angabe der absoluten Zahlen positiver und negativer Färbeergergebnisse.

Tabelle 8: Auflistung der Färbeergergebnisse (Positiv und Negativ) von HSP 60 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs in absoluten Zahlen in Hinblick auf die Einflussfaktoren „Kardiale Vorbelastung“, „Intoxikation“ (mit Alkohol oder anderweitigen Substanzen s.o.).

Tabelle 9: Auflistung der Färbeergebnisse (Positiv und Negativ) von HSP 60 in Leber und Gehirn des Unterkühlungs- und Kontrollkollektivs in absoluten Zahlen in Hinblick auf den Einflussfaktor „Liegezeit“.

## 9. Literaturverzeichnis

Agashe VR and Hartl FU. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 15–25

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 469–475

Bertini I, Cavallaro G, Rosato A. Cytochrome c: occurrence and functions. *Chem Rev* 2006; 106: 90–115

Birchmeyer MS ME. Wischnewski revisited. The diagnostic value of gastric mucosal ulcers in hypothermic deaths. *Am J Forensic Med Pathol* 1989; 10: 28–30

Bright F, Winskog C, Walker M, Byard RW. Why are Wischnewski spots not always present in lethal hypothermia? The results of testing a stress-reduced animal model. *J Forensic Leg Med* 2013; 20: 785–787

Currie RW, Ellison JA, White RF, Feuerstein GZ, Wang W, Barone FC. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal Hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of Hsp27. *IBRO Neurosci Rep* 2000; 863: 169–181

Dai H-J, Li D-W, Wang Y-X, Sun A-J, Lu Y-X, Ding X, Zhang M, Song Y-G, Huang X-D. Induction of heat shock protein 27 by bicyclol attenuates d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury. *Eur J Pharmacol* 2016; 791: 482–490

Doberentz E, Markwerth P, Wagner R, Madea B. Expression of Hsp27 and Hsp70 and vacuolization in the pituitary glands in cases of fatal hypothermia. *Forensic Sci Med Pathol* 2017; 13: 312–316



Doberentz E, Genneper L, Böker D, Lignitz E, Madea B. Expression of heat shock proteins (hsp) 27 and 70 in various organ systems in cases of death due to fire. *Int J Legal Med* 2014; 128: 967–978

Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516

Feder ME HG. Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones, And The Stress Response:. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 243–282

Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 1990; 346: 623–628

Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2006; 5: 2592–2601

Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 433–442

Garrido C. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ* 2002; 9: 483–485

Geserick G, Krockner K, Wirth I. Über die Wischnewski-Flecke - eine Literaturstudie. *Archiv für Kriminologie* 2018; 242: 73–96

Glass G, Papin JA, Mandell JW. SIMPLE: a sequential immunoperoxidase labeling and erasing method. *J Histochem Cytochem* 2009; 57: 899–905

Grantham J. The Molecular Chaperone CCT/TRiC: An Essential Component of Proteostasis and a Potential Modulator of Protein Aggregation. *Front Genet* 2020; 11: 172

Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 1996. 381: 571–580

Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol; from nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295: 1852-1858

Haslbeck M. sHSPs and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1649-1657

Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, Hendrix RW, Ellis RJ. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 1988; 333: 330–334

Hendrick JP and Hartl FU. Molecular Chaperone Functions Of Heat-Shock Proteins. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 349–384

Hirvonen J. Necropsy findings in fatal hypothermia cases. *Forensic Sci* 1976; 8: 155–164

Hsu S-M and Raine L. Protein A, Avidin, and Biotin in Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 1319–1353

Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. HSP70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* 1998; 17: 6124–6134

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239–257

Kim KK, Kim R, Kim SH. Crystal Structure of a small heat-shock protein. *Nature* 1998; 394: 595-599

Kim S, Willson KR, Horwich AL. Cytosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 543-548

Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *J Immunol* 2003; 171: 4672–4679

Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 743–761

Latchman DS. HSP27 and cell survival in neurones. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 393–402

Leak RK, Zhang L, Stetler RA, Weng Z, Li P, Atkins GB, Gao Y, Chen J. HSP27 protects the blood-brain barrier against ischemia-induced loss of integrity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013; 12: 325–337

Lowenstein DH, Ghan PH and Miles MF. The stress protein response in cultured neurons: characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity. *Neuron* 1991; 7: 1053–1060

Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie, Reg. Rüdigerstraße 14, D-70469 Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2009

Madea B, Preuß J, Lignitz E. Unterkühlung: Umstände, morphologische Befunde und ihre Pathogenese. *Rechtsmedizin (Berl)* 2004; 14: 41–59

Majno G and Joris I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 3–15

Mayer MP. Gymnastics of molecular chaperones. *Mol Cell* 2010; 39: 321–331

Mehlen P, Mehlen A, Guillet D, Preville X, Arrigo AP. Tumor necrosis factor-alpha induces changes in the phosphorylation, cellular localization, and oligomerization of human hsp27, a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *J Cell Biochem* 1995; 58: 248–259

Mizukami H, Shimizu K, Shiono H, Uezono T, Sasak M. Forensic diagnosis of death from cold. *Leg Med (Tokyo)* 1999; 1: 204–209

Motojima F. How do chaperonins fold protein? *Biophysics (Nagoya-shi)* 2015; 11: 93-102

Netzker R. *Biochemie*, Reg. Rüdigerstraße 14, D-70469 Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2008

Nishimura RN, Dwyer BE, Clegg K, Cole R, Vellis J. Comparison of the heat shock response in cultured cortical neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 1991; 9: 39–45

Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 505–512

Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantôme A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E and Garrido C. HSP 27 Is a Ubiquitin-Binding Protein Involved in I-kBa Proteasomal Degradation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5790–5802

Parsell DA and Lindquist S. The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance. *Annu Rev Genet* 1993; 27: 437–496

Parsell DA, Taulien J, Lindquist S. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1993; 339: 279-86

Pfeifer U, Müller-Hermelink HK, Roessner A. Allgemeine Pathologie, Reg. Hackerbrücke 6, D-80335 München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2008

Preuss J, Dettmeyer R, Poster S, Lignitz E, Madea B. The expression of heat shock protein 70 in kidneys in cases of death due to hypothermia. *Forensic Sci Int* 2008; 176: 248–252

Preuss J, Lignitz E, Dettmeyer R, Madea B. Pancreatic changes in cases of death due to hypothermia. *Forensic Sci Int* 2007; 166: 194–198

Ranford JC, Coates ARM, Henderson B. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med* 2000; 2: 1-17

Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1: 97–98

Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* 1999; 274: 18947-18956

Rossi MR, Somji S, Garrett SH, Sens MA, Nath J, Sens DA. Expression of hsp 27, hsp 60, hsc 70 and hsp 70 Stress Response Genes in Cultured Human Urothelial Cells (UROtsa) Exposed to Lethal and Sublethal Concentrations of Sodium Arsenite. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 1225–1232

Ryti NRI, Junttila MJ, Antikainen H, Kortelainen M-L, Huikuri HV, Jaakkola JJK. Coronary stenosis as a modifier of the effect of cold spells on the risk of sudden cardiac death: a case-crossover study in Finland. *BMJ open* 2018; 8: e020865

Samali A and Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 1998; 4: 228–236

Santoro MG. Heat Shock Factors and the Control of the Stress Response. *Biochem Pharmacol* 2000; 3: 55–63

Sarto C, Binz P-A, Mocarelli P. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis* 2000; 1218–1226

Schleich K, Lavrik IN. Mathematical modeling of apoptosis. *Cell Commun Signal* 2013; 11, 44. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-44> (Zugriffsdatum 11.04.2022)

Schlesinger MJ. Heat Shock Proteins. *J Biol Chem* 1990; 265: 12111–12114

Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1011–1032

Sharp FR, Zhan X, Liu D-Z. Heat shock proteins in the brain: role of Hsp70, Hsp 27, and HO-1 (Hsp32) and their therapeutic potential. *Transl Stroke Res* 2013; 4: 685–692

Stetler R A, Gao Y, Signore A P, Cao G, Chen J. HSP27: mechanisms of cellular protection against neuronal injury. *Curr Mol Med* 2009; 9: 863–872

Stetler RA, Gan Y, Zhang W, Liou AK, Gao Y, Cao G, Chen J. Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 2010; 92: 184–241

Thériault JR, Lambert H, Chávez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P, Landry J. *J Biol Chem* 2004; 279: 23463-23471

Tsokos M, Rothschild MA, Madea B, Rie M, Sperhake JP. Histological and immunohistochemical study of Wischnewsky spots in fatal hypothermia. *Am J Forensic Med Pathol* 2006; 27: 70–74

Türk EE, Sperhake JP, Pueschel K, Tsokos M. An Approach to the Evaluation of Fatal Hypothermia. *Forensic Sci Med Pathol* 2005; 1: 31–35

Valtonen RIP, Kiviniemi A, Hintsala HE, Ryti NRI, Kenttä T, Huikuri HV, Perkiömäki J, Crandall C, van Marken Lichtenbelt W, Alén M, Rintamäki H, Mäntysaari M, Hautala A, Jaakkola JJK, Ikäheimo TM. Cardiovascular responses to cold and submaximal exercise in patients with coronary artery disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2018; 315: R768-R776

Van Montfort R, Slingsby C, Vierling E. Structure and function of the small heat shock protein/ $\alpha$ -crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* 2001; 59: 105-156

Vargas-Parada L, Solís CF, Laclette JP. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology* 2001a; 122: 383–388

Vargas-Parada L, Solís CF, Laclette JP. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology* 2001b; 122: 383–388

Yam AY, Xia Y, Lin H-TJ, Burlingame A, Gerstein M, Frydman J. Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 1255-1262