Expression von Hitzeschockproteinen (HSP27, 60, 70) und Aquaporinen (AQP1 und 3) in verschiedenen Organsystemen beim Tod durch Unterkühlung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med.

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Alexandra Marion Hengstermann

aus Frankfurt a. M.

2025

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Burkhard Madea
2. Gutachter: Prof. Dr. Karl Schilling

Tag der mündlichen Prüfung: 2.9.2025

Aus dem Institut für Rechtsmedizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 6

1. Einleitung 8

1.1 Thermoregulation im menschlichen Körper 8

1.2 Systemische Wirkungen veränderter Körpertemperatur 9

1.3 Risikofaktoren und Prävalenz der Hypothermie 12

1.4 Pathophysiologische Vorgänge bei Hypothermie 12

1.5 Forensische Befunde bei Hypothermie 14

1.5.1 Äußere Befunde 14

1.5.2 Innere Befunde 14

1.6 Chaperone – Heat-Shock-Proteine (HSPs) 16

1.6.1 HSP27 17

1.6.2 HSP60 18

1.6.3 HSP70 19

1.7 Aquaporine (AQPs) 20

1.7.2 Aquaporin 3 27

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit 28

2. Material und Methoden 30

2.1 Hypothermiekollektiv 30

2.2 Kontrollkollektiv 30

2.3 Datenerhebung für die Immunhistochemie 32

2.3.1 Asservierung / Fixation 32

2.4 Färbungen 32
2.4.1 Hämatoxylin-Eosin- (HE) 32
2.4.2 Immunhistochemische Färbung 33
2.5 Histologische Beurteilung der Präparate 35
2.6 Statistische Auswertung 37
2.7 Färbeprotokoll der HE- Färbung 37
2.8 Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbungen 38
2.8.1 Entparaffinierung und Vorbehandlung zur Demaskierung der Antigene 38
2.8.2 LSAB- Methode 39
2.8.3 Färbeprotokoll AQP- Färbung 40
3. Ergebnisse 45
3.1 Geschlecht, Alter und Organgewicht 45
3.2 Hypothermiebefunde im Hypothermiekollektiv 45
3.3 Todeszeit nach Jahreszeit in Monaten und Auffindesituationen im Hypothermiekollektiv 46
3.4 Aquaporin-Expression- Hypothermiekollektiv versus Kontrollkollektiv 47
3.4.1 Expression von AQP1 47
3.4.2 Expression von AQP 3 50
3.5 Heat-shock-Protein (HSP)-Expression – Hypothermiekollektiv versus Kontrollkollektiv 53
3.5.1 Expression von HSP27 53
3.5.2 Expression von HSP60 55
3.5.3 Expression von HSP70 57
3.6 AQP- und HSP-Expression – Vergleich Hypothermie- vs. Kontrollkollektiv 59
3.7 Korrelation zwischen BMI und Proteinexpression 61
3.8 Vorerkrankungen im Hypothermie- und Kontrollkollektiv 62

4. Diskussion 64
4.1 Limitationen der Studie 64
4.2 Aquaporine 65
4.2.1 Expression von AQP bei renalen Vorerkrankungen 66
4.2.2 Expression von Aquaporinen bei hepatischen Vorerkrankungen 69
4.2.3 Expression von Aquaporinen bei kardialen Vorerkrankungen 72
4.3 Heat-shock-Proteine 75
4.3.1 HSP-Expression bei kardialen Vorerkrankungen 76
4.3.2 HSP-Expression bei hepatischen Vorerkrankungen 78
4.3.3 HSP-Expression bei renalen Vorerkrankungen 80
4.4 Ausblick 82
5 Zusammenfassung 84
6 Anhang 86
7 Abbildungsverzeichnis 94
8 Tabellenverzeichnis 96
9 Literaturverzeichnis 97
10 Erklärung zum Eigenanteil 112
11 Danksagung 113

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ADH	antidiuretisches Hormon
ADPKD	autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
AKI	acute kidney injury
AQP	Aquaporin
ARDS	acute respiratory distress syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	body mass index
BNP	brain natriuretic peptide
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CD	cluster of differentiation
CHIP	channel forming intrinsic protein
DAXX	death domain associated protein
EKG	Elektrokardiogramm
ER	endoplasmatisches Retikulum
FOLFOX	Folinsäure, 5-Flurouracil, Oxaliplatin
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämalaun- Eosin
HIF	hypoxie-induzierter Faktor
HSC	heat shock cognate
H2O2	Wasserstoffperoxid

HSF-		Hitzeschockfaktor
HSP-		Heat-Shock-Protein
HZV-		Herzzeitvolumen
IL		Interleukin
LSAB-		labelled streptavidin-biotin
MAP-		mitogen activated protein
MHC-		major histocompatibility complex
MIP-		major intrinsic protein
mRNA-		messenger Ribonukleinsäure
NO-		Stickstoff
NAFLD-		non-alcoholic fatty liver disease
PCLD-		polycystic liver disease
RCC-		renal cell carcinoma
ROI-		region of interest
ROSC-		return of a spontaneous circulation
sHSP	-	small heat shock protein
SIADH-		Syndrom der inadäquaten
ADH-		Sekretion
SSW-		Schwangerschaftswoche
TAG-		Triacylglycerin
TNM-		Primärtumor, Lymphknotenbefall, Metastasen

1. Einleitung

1.1 Thermoregulation im menschlichen Körper

Im Gegensatz zu „poikilothermen“ (wechselwarmen) Tieren, deren Körpertemperatur der Umgebungstemperatur folgt, ist der Mensch „homoiotherm“ (gleichwarm). Im menschlichen Organismus herrscht ein Gleichgewicht zwischen Wärmebildung und -abgabe, so dass die Körpertemperatur konstant und weitgehend unabhängig von Umwelteinflüssen zwischen 36,0-37,0°C beträgt. Unterschieden werden Körperkern- und Körperschalentemperatur: zum Körperkern gehören das Gehirn und das Rumpfinnere mit den stoffwechselintensiven Organen. Hier werden unter Ruhebedingungen ca. 70 % der gesamten Wärme produziert (s. Abb. 1). Zur „Körperschale“ zählen die Haut und periphere Bereiche wie die Extremitäten. (Klinke et al., 2005)

Die Körperkerntemperatur unterliegt interindividuellen und zirkadianen Schwankungen um ca. 0,5-0,7°C mit maximalem Wert am Abend. Weitere Einflussfaktoren sind körperliche Aktivität oder der Menstruationszyklus: 1-2 Tage nach der Ovulation steigt die Basaltemperatur um etwa 0,5°C an und fällt am Ende des Zyklus wieder ab, sofern keine Schwangerschaft eintritt. (Klinke et al., 2005)

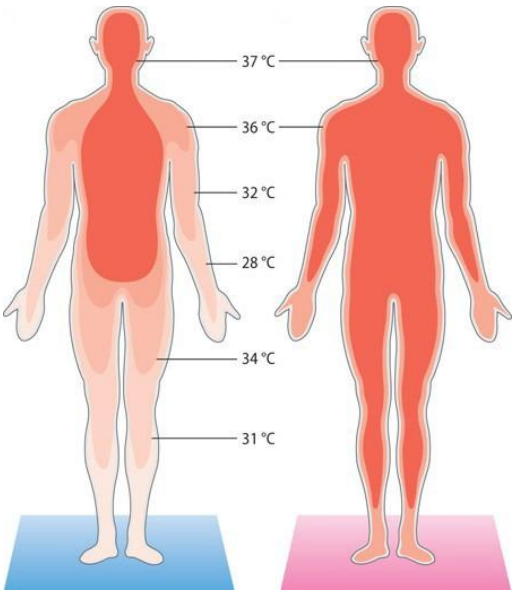

Abbildung 1 Thermoregulation des Menschen aus Schmidt-Lang, 2007

Das Hauptprinzip der Thermoregulation beruht auf der negativen Rückkopplung. Freie Nervenendigungen in Haut, Abdominalorganen, Rückenmark, Hirnstamm und Hypothalamus (=Thermosensoren) messen kontinuierlich die Temperatur der Körperschale und damit indirekt die Umgebungstemperatur. Damit erfassen sie drohende Störungen der Wärmebilanz, noch bevor sich die Temperatur im Körperkern verändert. Diese Information wird über das Rückenmark und den Thalamus zum Hypothalamus (Regulationszentrum), limbischen System und sensorischen Kortex (Temperaturwahrnehmung) weitergeleitet. Im Hypothalamus wird der Ist-Wert mit dem Soll-Wert abgeglichen. Weiter befinden sich hier Thermosensoren, die die Körperkerntemperatur messen. Bei einer Differenz zwischen Ist- und Soll-Wert löst der Organismus eine Regelantwort aus. Diese beginnt mit einer Verhaltensmodifikation wie die Verkleinerung der effektiven Körperoberfläche durch Zusammenkauern bei Kälte. Reicht dies für einen ausreichenden Anstieg der Temperatur nicht aus, setzt eine aktive Wärmebildung des Organismus ein. Sie erfolgt durch Variation der Hautdurchblutung, Sekretion der Hormone Thyroxin und Adrenalin sowie die Erhöhung der Aktivität des Herzens, der Lunge und der Skelettmuskulatur, z. B. durch Kältezittern. (Klinke et al., 2005)

Die Wärmeabgabe beruht auf den physikalischen Prinzipien der Konduktion, Konvektion, Strahlung und Verdunstung. Der Wärmetransport erfolgt hauptsächlich über das Blut zu Haut und Lunge, wo sie an die Umwelt abgegeben werden kann. Durch Vasodilatation steigt die Durchblutung von Haut und Muskeln an und das Herzzeitvolumen (HZV) nimmt zu, so dass die Wärme in die Peripherie geleitet und die Körperkerntemperatur an den Soll-Wert angepasst wird. Bei körperlicher Belastung erfolgt annähernd die gesamte Wärmeabgabe durch Verdunstung von sezerniertem Schweiß. (Klinke et al., 2005)

1.2 Systemische Wirkungen veränderter Körpertemperatur

Eine Hyperthermie (Körperkerntemperatur > 38°C) löst eine periphere Vasodilatation und konsekutiv relative Hypovolämie aus. Dadurch verringert sich die zerebrale Durchblutung, es kommt zur Hitzeerschöpfung und Hitzekrämpfen (Tab. 1). Ursachenabhängig wird zwischen Hyperthermie und Fieber unterschieden: Bei der Hyperthermie resultiert die erhöhte Körpertemperatur aus einer gestörten Wärmeabgabe oder gesteigerten

Wärmeproduktion (z. B. maligne Hyperthermie), der Temperatursollwert bleibt konstant. Bei Fieber kommt es dagegen zu einer Sollwertverschiebung im Hypothalamus: Die Körperkerntemperatur wird durch eine verminderte Wärmeabgabe oder Steigerung der Produktion auf den neuen Wert angehoben, z. B. durch Verminderung der Hautdurchblutung oder Muskelzittern. (Klinke et. al, 2005, Wilhelm, 2013)

Bei einer Temperatur von > 44°C bricht die Autoregulation des Körpers zusammen, Proteine denaturieren und es kommt schlussendlich zum Tod des Organismus. (Klinke et al., 2005)

Bei einer Hypothermie (Körperkerntemperatur < 35°C) versucht der Organismus initial, durch Verringerung der Wärmeabgabe (z. B. Konstriktion der peripheren Gefäße), Veränderung der Körperhaltung (Verringerung der Körperoberfläche) und gesteigerte Wärmebildung (Erhöhung des Grundumsatzes) die Temperatur zu regulieren. Bei einem weiteren Absinken tritt eine Vigilanzminderung und Dämpfung des Atemantriebs ein. Bei Temperaturen < 30°C sind bradykarde Herzrhythmusstörungen möglich, < 27°C Kammerflimmern oder eine Asystolie. (Müller und Sönke, 2007) Durch die verminderte Stoffwechselrate sinkt der Sauerstoffverbrauch einzelner Organe und erhöht die Hypoxietoleranz. (Klinke et al., 2005)

Tabelle 1Systemische Reaktionen in Abhängigkeit von der Körperkerntemperatur (Klinke et al., 2005)

Temperaturbereiche	**Konsequenz**
>44°C	Denaturierung von Proteinen, Hitzetod
40 – 44°C	Versagen der Thermoregulation, Hitzschlag, Krämpfe
38 – 40°C	Fieber, Hypothermie
36 – 38°C	Normothermie
33 – 36°C	milde Hypothermie: Kältezittern, Stoffwechselsteigerung
30 – 33°C	Stoffwechselsteigerung, Bewusstseinstrübung, Atemdepression

Temperaturbereiche	**Konsequenz**
27 – 30°C	tiefe Hypothermie: Versagen der Thermoregulation, Kammerflimmern
20 – 27°C	„Scheintod“, lichtstarre Pupillen, Bradykardien, -arrhythmien
<20°C	Asystolie, Kältetod

Die Immersionshypothermie beschreibt eine Unterkühlung im Wasser beispielsweise nach Alkoholgenuss, bei einem Sturz von einem Schiff oder beim Einbrechen in vereiste Wasserflächen. Auch Wassertemperaturen deutlich oberhalb des Gefrierpunktes führen bei fortgesetzter Kälteexposition zu einer drastisch herabgesetzten Überlebenszeit (s. Tab. 2). Durch körperliche Anstrengung (z. B. Schwimmen im kalten Wasser) erhöht sich die Abkühlungsgeschwindigkeit des Körpers um 30-50 %. Für eine generalisierte Hypothermie reicht bereits durchnässte Kleidung aus. Bei einem akzidentellen Sturz in < 10°C kaltes Wasser kann durch eine sofortige generalisierte Hemmung von Kortex und Subkortex ein reflektorischer Kälteschock eintreten (Madea, 2003). Durch die zu einer Unterkühlung „im Trockenen“ verkürzten Agonie sind hypothermietypische Befunde häufig nicht oder gering ausgeprägt (Madea, 2003). Dies betrifft möglicherweise auch die molekulare Ebene durch geringere Veränderung der Aquaporin- (AQP) und Heat-Shock-Protein (HSP)-Expression.

Tabelle 2 Überlebenszeit in Abhängigkeit der Wassertemperatur (Madea, 2003)

Wassertemperatur	**Überlebenszeit**
20°C	ca. 40 h
15°C	ca. 5 h
10°C	ca. 3 h
5°C	ca. 2 h

Wassertemperatur	**Überlebenszeit**
0°C	nach 30 Min. akute Lebensgefahr

1.3 Risikofaktoren und Prävalenz der Hypothermie

Zu den Gruppen mit einem höheren Risiko für eine Hypothermie zählen verwirrte oder demenziell vorerkrankte Patienten, die sich in der kalten Jahreszeit verlaufen und den Heimweg nicht mehr finden. Eine weitere Risikogruppe stellen Unfallopfer oder polytraumatisierte Patienten dar, die sich aus eigener Kraft nicht befreien können und bei denen die Hypothermie zu sekundären Komplikationen führt: Koagulopathie, Herzrhythmusstörungen oder posttraumatisch gesteigerte Infektanfälligkeit. (Mommsen et al., 2011) Auch Menschen mit chronischem Alkohol- oder Drogenkonsum sind häufiger betroffen, ebenso Personen, die bewusstseinsverändernde Medikamente einnehmen. Weitere Risikofaktoren sind ein sehr niedriges oder hohes Lebensalter, Immobilität bzw. Bettlägerigkeit, Obdachlosigkeit und ein niedriger sozioökonomischer Status. (Fliß, 2012)

Im Sektionsgut von Großstädten machen Todesfälle durch Hypothermie ca. 1 % aus, in ländlichen Regionen bis 2 %. Etwa die Hälfte aller Verstorbenen ist zum Todeszeitpunkt deutlich alkoholisiert (durchschnittlicher Blutalkoholgehalt: 1,3‰). (Madea, 2003)

1.4 Pathophysiologische Vorgänge bei Hypothermie

Eine Körperkerntemperatur von unter 35°C wird als Hypothermie bezeichnet. Wird die Verringerung der Temperatur absichtlich herbeigeführt, spricht man von induzierter Hypothermie, ist sie unbeabsichtigt, gilt sie als akzidentell. (Larsen, 2016)

Hypothermie entsteht, wenn der Wärmeverlust des Körpers größer ist als die Wärmebildung. (Madea, 2003) Mögliche Ursachen sind endogene Prozesse wie metabolische Entgleisungen aufgrund von Hypothyreose, Hypoglykämie, Kachexie, Hypoadrenalismus oder eine zentrale Dysfunktion mit Beteiligung der Thermoregulation (z. B. hypophysäre Insuffizienz). (Herrmann und Mann, 2013, Seekamp, 2008) Die akzidentelle Hypothermie ist die Folge eines unbeabsichtigten Aufenthalts in kalter

Umgebungstemperatur oder kaltem Wasser. Auch hohe Windgeschwindigkeiten (z. B. Fahrtwind) steigern den Wärmeverlust. Die Dauer der Kälteexposition ist entscheidend für die physiologischen Folgen. So können auch Wassertemperaturen um 20°C zu einer Unterkühlung führen. (Madea et al., 2004)

Unter Alkoholeinfluss verringern sich vasokonstriktive Mechanismen, die der Hypothermie entgegenwirken. Infolge der Gefäßdilatation entsteht ein subjektives Wärmegefühl, das durch Entfernen von Kleidungsstücken die bestehende Hypothermie aggraviert. (Madea et al., 2004) Durch die Kälteeinwirkung reduziert sich die Durchblutung des Gehirns und die Diffusion der Wassermoleküle innerhalb des Cortex (Bertalan et al., 2019), was die Entscheidungsfindung und Leistungsfähigkeit negativ beeinflusst.

Bei leichter Hypothermie (36–33°C) sind die Regulationsmechanismen des Organismus noch intakt. Die Wärmeneubildung ist durch Steigerung des Energieumsatzes als Muskelzittern erkennbar. Durch die verminderte Durchblutung der Peripherie infolge der Vasokonstriktion entsteht ein Temperaturgefälle zwischen Körperkern und Körperschale. Die Akren werden als schmerzhaft empfunden. (Madea, 2003)

Bei einer moderaten Hypothermie zwischen 32 und 34°C führt die Hemmung der Sekretion des Antidiuretischen Hormons zur Kältediurese. Folglich nimmt die Viskosität des Blutes zu und die Gewebeoxygenierung verschlechtert sich. (van Aken et al., 2014) Aufgrund einer verminderten Aktivität temperaturabhängiger Enzyme ist die Funktion von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten beeinträchtigt. (Flohé et al., 2018) Das Kältezittern lässt nach, die progrediente Eintrübung des Bewusstseins führt zu Desorientierung und Apathie. Das HZV verringert sich, außerdem nimmt die bronchiale Sekretion stark zu. (Merkel, 2014)

Weiterhin kommt es aufgrund von Elektrolytverschiebungen (bedingt durch einen Kalium-Shift nach intrazellulär bei konstanter Natriumkonzentration) zu elektrokardiografischen (EKG-) Veränderungen wie QRS-Verbreiterungen, PQ-Verlängerungen oder Störungen der intraventrikulären Erregungsausbreitung. Das HZV und der myokardiale Sauerstoffverbrauch nehmen ab; häufig findet sich eine begleitende Hypotonie. (Larsen, 2016) Es kommt zu Bradykardien oder Bradyarrhythmien. Die Flimmerbereitschaft des Herzens steigt bei einer Körperkerntemperatur < 30°C an, bei < 28°C kommt es zu

spontanem Kammerflimmern. (Müller und Sönke, 2007) Atemfrequenz und -tiefe nehmen bei sinkender Temperatur ab, bei < 24°C sistiert die Atmung gänzlich. (Larsen, 2016)

Der Sauerstoff- und Energiebedarf des Organismus sinkt ab, was therapeutisch genutzt werden kann, z. B. nach Reanimation bei Return of a spontaneous circulation (ROSC). Die Unterkühlung hat protektive Effekte auf den Hirnstoffwechsel. Eine milde Hypothermie wird inzwischen regelhaft für Patienten nach Herzstillstand und erfolgreicher Reanimation eingesetzt. (Bernard et al., 2009)

1.5 Forensische Befunde bei Hypothermie

Die Todesursache Unterkühlung lässt sich nicht anhand eines einzelnen Befundes verifizieren. Isoliert betrachtet ist jeder Befund unspezifisch; erst die Kombination aus morphologischen Hinweisen, der Auffindesituation der Leiche und der Anamnese erhärtet potentiell den Verdacht. Zu beachten ist, dass die Diagnose "Unterkühlung" in einigen Fällen eine Ausschlussdiagnose darstellt. Häufig sind nicht alle potentiell möglichen Befunde vorhanden, da sich z. B. bei Ertrinkungsunfällen mit konsekutiver Hypothermie aufgrund des kurzen zeitlichen Intervalls bis zum Eintritt des Todes nicht alle kälteassoziierte Veränderungen ausprägen. (Madea, 2003)

1.5.1 Äußere Befunde

- Durchgehend hell-rötlich gefärbte Totenflecke (Livores): Leichen, die auf einer kühlen Unterlage gelagert werden, zeigen lediglich an den Rändern helle Totenflecke. Zudem besteht das Risiko einer Verwechslung mit einer Kohlenstoffmonoxid-Intoxikation. (Madea, 2003)
- "Gänsehautbildung": Diese kann auch Ausdruck der Totenstarre sein. (Madea, 2003)
- Kälteerytheme: Blau-livide Verfärbungen der Haut mit teigiger Schwellung von meist glänzender Beschaffenheit, v.a. der Akren, Handrücken und Streckseiten der Kniegelenke. (Madea, 2003)

1.5.2 Innere Befunde

- Hellrotes Blut in peripheren Gefäßen und dunkelrotes Blut in den Organen: Letztere werden auch bei Kreislaufzentralisation weiterhin durchblutet. (Madea, 2003)

- Wischnewski- Flecken: "Leopardenfellartige" hämorrhagische Einblutungen der Magen- und gelegentlich auch der Duodenalschleimhaut. (Madea, 2003)
- Streifige oder flächige Einblutungen in den Musculus psoas und Musculus iliopsoas: Dem Austritt des Blutes in die Muskulatur liegt vermutlich eine hypoxiebedingte vakuolige Degeneration der Gefäßmedia zugrunde. (Dirnhofer und Sigrist, 1979) Die während der Exzitationsphase entstehenden Einblutungen werden selten beschrieben. (Madea, 2003)
- Kollabierte Milz: Bei fortdauernder Kältewirkung als Ausdruck der Verschiebung des Blutvolumens im Schock. Morphologisch erkennbar ist eine feine Fältelung der Kapsel bei ansonsten kollabiertem Zustand des Organs. (Madea, 2003) Vermutlich induziert die Adrenalin-Freisetzung die Ausschüttung des Blutes aus der Milz, um den erhöhten Sauerstoff-Bedarf des Organismus zu decken. (Mengel, 2009)
- Blutungen der Synovia bzw. Blutbeimengungen der Synovialflüssigkeit der Kniegelenke: Die Kälteeinwirkung führt initial sowohl zu einer arteriellen als auch venösen Vasokonstriktion, im weiteren Verlauf aber zu einer Vasodilatation. Bei verringerter Blutzirkulation kommt es zur Stase mit Erythrozytenanschoppung und -aggregation, Thrombose und schlussendlich Rhexisblutung. (Mengel, 2009)
- Epithelverfettung der Nierentubuli: Dies ist möglicherweise eine Folge der schockbedingten Hypoxie. Die Folge ist eine gesteigerte Mobilisation von Triglyzeriden, die von den Tubuli absorbiert werden. (Byard und Payne-James, 2015)
- Veränderungen des Pankreas: Dazu zählen eine akute oder hämorrhagische Pankreatitis, Fettnekrosen, Serum-Amylase-Erhöhung und eine Leukozyteninfiltration. Als Ursache werden Mikrothromben der Gefäße durch Schock und verschlechterte rheologische Eigenschaften der Gerinnung vermutet. Aufgrund einer verringerten Membranpermeabilität nimmt die Exozytose ab. (Byard und Payne-James, 2015)

Die bedeutendsten Befunde bei Unterkühlungen sind Kälteerytheme und Wischnewski-Flecken. Sie lassen sich in ca. 60 % aller Fälle detektieren. (Madea, 2003)

1.6 Chaperone – Heat-Shock-Proteine (HSPs)

Der Name "Chaperone" bezeichnet im Französischen eine Anstandsdame. Molekulare Chaperone sind Proteine, die vielfältige Aufgaben innerhalb der Zelle übernehmen: Durch Kontrolle von Faltungsprozessen verhindern sie eine inkorrekte Proteinkonfiguration und die Aggregation fehlgefalteter Proteine. Die räumliche Anordnung der Proteine ist grundsätzlich durch die Abfolge der Aminosäuresequenz festgelegt, aufgrund der Reaktionsfreudigkeit hydrophober Seitenketten können sich im ungefalteten Zustand aber Proteinaggregate bilden, was Chaperone durch Abschirmung der Seitenketten verhindern. (Calloni et al., 2012) Außerdem unterstützen Chaperone die Assemblierung von Proteinuntereinheiten sowie die Translokation von Proteinen durch Membranen (z. B. beim Proteinimport in Mitochondrien) und schützen die Zelle vor Apoptose. In den letzten Jahren konnte zudem nachgewiesen werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der Antigen-Präsentation spielen. Hierbei helfen sie, Antigene auf den major histocompatibility complex (MHC) zu übertragen. Als extrazellulär vorkommende Proteine stimulieren sie Makrophagen und dendritische Zellen. (Li und Srivastava, 2004) Das Chaperon verhindert unproduktive Verbindungen zwischen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Histonen. (Laskey et al., 1978)

Die zu den Chaperonen zählenden HSPs kommen in allen Organismen vor und sind Bestandteil der Zellen und Zellkompartimente. (Doberentz und Madea, 2019) Die erhöhte Expression als Reaktion auf Stress ist ein Schlüsselprozess zur Sicherung der Zellintegrität zum Überleben des Organismus. Im Gegensatz zu Enzymen mit ihren substratspezifischen aktiven Zentren interagieren Chaperone mit einer Vielzahl verschiedener Substrate. (Saibil, 2013)

Konstitutiv vorkommende Hitzeschockproteine werden als "heat shock cognate" bezeichnet. (Gressner und Arndt, 2012) Sie wurden erstmals von Ritossa 1962 in der Literatur beschrieben. Er setzte Zellen der Fruchtfliege Drosophila melanogaster Hitze aus, wodurch in den Chromosomen der Speicheldrüsenzellen ein charakteristisches „Puff-Muster“ induziert wurde. (Ritossa, 1962) Mit diesen Experimenten wies er nach, dass eine Änderung der Umgebungstemperatur die Genexpression der Zelle verändert.

Der Name "Hitzeschockprotein" bezieht sich auf die gesteigerte Synthese der Proteine unter anderem bei erhöhter Temperatur. Weitere Induktoren sind Hunger, inflammatorische Prozesse, Ischämie / Reperfusion und virale / bakterielle Infektionen. (Gressner und Arndt, 2012) Auch flüchtige Schwermetalle, Oxidantien, freie Radikale, analoge Aminosäuren, anti-neoplastische Chemikalien, Toxine, Hormone oder Wachstumsfaktoren, pH-Verschiebungen sowie Onkogene und Protoonkogene erhöhen die HSP-Expressionsrate indirekt über die Zunahme fehlkonfigurierter oder nicht-gefalteter Proteine. Auslöser für die Synthesesteigerung ist demnach die Denaturierung von Proteinen (Genneper, 2016). HSPs verhindern Schäden entweder durch Rückfaltung der Proteine oder, wenn dies nicht mehr möglich ist, durch einen beschleunigten Abbau.

Häufig lässt sich bei Autoimmunerkrankungen (z. B. chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis) im Serum des Patienten eine Immunantwort gegen HSPs nachweisen. (Chiricosta et al., 2020, Hoter und Naim, 2019)

Durch die Regulierung der Angiogenese, Zellproliferation, Migration, Invasion und Metastasierung spielen HSPs eine zentrale Rolle bei der Kanzerogenese. Sie unterstützen onkogene und metastatische Signalwege innerhalb der Zelle (Yun et al., 2019) und auch die Resistenzentwicklung gegen einige Zytostatika. Weiter werden HSPs als Biomarker bei der Krebsdiagnose und -prognose sowie als therapeutische Zielmoleküle klinisch eingesetzt. (Wu et al., 2017)

Die Klassifizierung der HSPs erfolgt anhand ihrer Größe, Funktion und Struktur. (Lindquist, Craig, 1988)

1.6.1 HSP27

HSP27 gehört mit einer molekularen Masse von 25-30 kDa zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine (small heat shock protein, sHSPs). HSP27 unterstützt unabhängig von einer Adenosintriphosphat- (ATP) Zufuhr die Entfaltung und Rückfaltung geschädigter Proteine. (Jakob et al, 1992) Außerdem wirkt es bei oxidativem Stress als Antioxidans, indem es die Konzentration freier Radikale senkt. (Vidyasagar et al., 2012)

Das wichtigste sHSP-Strukturmerkmal – die alpha-Cristallin-Domäne – weist Ähnlichkeit mit α-A/B-Cristallin auf, einem Protein der humanen Augenlinse. (Garrido et al, 2006,

Kato, 2011, Mehlen und Arrigo, 1994) Das konstitutiv exprimierte HSP27 ist im physiologischen Zustand in der Nähe des Golgi-Apparates im Zytosol lokalisiert und wandert nach einem thermischen Reiz in die Nähe des Nukleus. (Mehlen und Arrigo, 1994)

HSP 27 spielt eine Schlüsselrolle beim Schutz vor spontaner oder durch Zytostatika erzwungener Apoptose. (Ciocca und Calderwood, 2005) Durch Bindung an mitochondriale Proteine (z. B. Cytochrom C) und zytosolische (z. B. domain associated protein (DAX)) werden sowohl der ex- als auch der intrinsische Apoptoseweg gehemmt. (Vidyasagar et al., 2012)

Verschiedene Krebsentitäten (z. B. Magen-, Leber- und Prostatakarzinome, Osteosarkome) zeigen eine HSP27-Überexpression. Die Resistenz gegen Chemotherapeutika bei einigen Leukämieformen und die assoziierte schlechtere Prognose sind auf dieses Protein zurückzuführen. (Ciocca und Calderwood, 2005)

1.6.2 HSP60

Die aus 14 Untereinheiten aufgebauten HSP60-Proteine bzw. Chaperonine bilden einen fassartigen Komplex, in dem sich größere Proteine falten können. Im Detail wurde der Mechanismus am bakteriellen Chaperonin GroEL untersucht: jeder Komplex besteht aus zwei Kammern, die während der Faltung des Gastproteins durch einen "Deckel" verschlossen sind. Die Kammern schließen und öffnen sich ATP-abhängig im Wechsel, somit ist die Abgabe eines fertig gefalteten Proteins an die Aufnahme eines weiteren, ungefalteten Proteins gekoppelt. (Koolmann und Röhm, 2003)

HSP60 kommt hauptsächlich in den Mitochondrien vor, wurde aber in den letzten Jahren sowohl in der Zellmembran als auch extrazellulär, z. B. im zirkulierenden Blut nachgewiesen. (Cappello und Conway de Macario, 2008)

HSP60 löst in Zellen des angeborenen Immunsystems eine starke proinflammatorische Reaktion aus und fungiert als Gefahrensignal für gestresste oder geschädigte Zellen. Während der Karzinogenese bestimmter Tumorentitäten verändern sich die HSP60-Spiegel des Zytosols, daher ist es als Biomarker für die Prognose und Diagnose präneoplastischer und neoplastischer Läsionen geeignet. (Nakamura und Minegishi, 2013)

1.6.3 HSP70

Die fünf Untergruppen von HSP70 (68-110 kDa) kommen hauptsächlich im Zytosol vor. Unter Stress wandern sie jedoch in den Nukleolus ab. (Morimoto und Milarski, 1990)

Das Molekulargewicht der HSP 70-Familie beträgt zwischen 68 und 110 Da. Als heat shock cognate (HSC) werden die HSP70-Proteine konstitutiv exprimiert. (Miernyk, 1999) Bei Stressreizen unterschiedlicher Art für die Zelle wird ihre Synthese gesteigert.

Der Aufbau aller HSP70- Proteine ist ähnlich und besteht aus drei Domänen: einem N-terminalen Ende, welches über eine ATPase-Aktivität verfügt, eine Substratbindungsdomäne, die ungefaltete Proteine und kurze, lineare Peptide mit hydrophoben Resten bindet und einem C-terminalen Ende, die der Substraterkennung und -stabilisierung dient. (Fernández-Fernández und Valpuesta, 2018, Haas und Meo, 1988, Hendrick und Hartl, 1993)

Die Mitglieder der HSP70-Familie kontrollieren alle Aspekte der zellulären Proteostase (z.B. die Proteinkettenfaltung, Proteinimport in Organellen, Rückgewinnung von Proteinen aus Aggregation und den Zusammenbau von Multiproteinkomplexen. (Radons, 2016)

Zudem besitzt HSP70 eine antiapoptotische Wirkung: Zellen, deren HSP-Expression herunterreguliert wurde, sind empfindlich gegenüber Apoptose; eine Überexpression von HSP70 wiederum verbessert das Überleben der Zellen. Wie HSP27 hemmt HSP70 sowohl den intrinsischen (mitochondrialen) als auch extrinsischen (todesrezeptorvermittelten) Weg der Apoptose. (Kumar und Stokes, 2016)

HSP70 stimuliert das angeborene Immunsystem, indem es die dendritischen Zellen initiiert. (Milani et al., 2002) Diese nehmen Antigene aus dem Extrazellulärraum auf, prozessieren sie, migrieren in den nächstgelegenen Lymphknoten und präsentieren sie cluster of differentiation (CD) 4+- Lymphozyten.

Patienten mit Autoimmunerkrankungen entwickeln häufig eine Immunantwort gegen HSPs. Bei der Vitiligo wurde eine Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und vermehrter HSP70-Expression nachgewiesen. (Doss et al., 2016)

1.7 Aquaporine (AQPs)

Bereits um 1920 wurde postuliert, dass Wasser über die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran ins Innere der Zelle diffundiert. (Langmuir, 1917, Gorter und Grendel, 1925) In den 1950er Jahren entdeckten Wissenschaftler, dass menschliche Erythrozyten über eine hohe und selektive Wasserleitfähigkeit verfügen, die auf porenartige Proteine zurückzuführen ist. (Paganelli und Solomon, 1957) Diese Kanalproteine erhöhen die Geschwindigkeit des Konzentrationsausgleichs zwischen Zellinnerem und -äußerem. In einem Versuch von Macey konnte 1970 durch Blockieren der Kanäle mittels Quecksilberionen eine deutliche Verringerung des Wassereinstroms in die Zelle gezeigt werden. (Macey und Farmer, 1970) 1992 wurde AQP1 (Synonym: channel-forming intrinsic protein: CHIP28) in humanen Erythrozyten nachgewiesen. Hierzu wurden Versuche mit Oozyten des Krallenfroschs Xenopus laevis durchgeführt. Normalerweise ist die Oozytenmembran für Wasser undurchlässig, aber nach Injektion von messenger Ribonukleinsäure (mRNA), die dieses Protein kodierte, platzten die in destilliertes Wasser gelegten Oozyten, während die Kontrolloozyten intakt blieben. Hiermit war der Beweis erbracht, dass es sich bei dem AQP1 um einen Wasserkanal handelt. (Preston und Agre, 1992)

Aquaporine kommen in Prokaryonten und Eukaryonten vor. Sie leiten Wasser mit hoher Geschwindigkeit durch die Zellmembran und blockieren gleichzeitig die Passage von Ionen wie z. B. Natrium oder Kalium. Sie werden daher hauptsächlich in Zellen exprimiert, die große Mengen Flüssigkeit in kurzer Zeit absondern oder transportieren müssen (z. B. in Epithelzellen der Niere oder in exokrinen Zellen. (Alberts et al., 2017)

Beim Menschen wurden AQPs im Nierenepithel, in Erythrozyten, in der Augenlinse, in Tränen- und Speicheldrüsen und den Astrozyten des Gehirns nachgewiesen. Ein Defekt oder eine Fehlfunktion dieser Proteine verursacht Erkrankungen wie Diabetes insipidus oder Katarakt. (de Groot et al., 2003) Wirbeltiere besitzen 11-13 AQP-Gene. (Agre et al., 2002)

Beim Menschen sind 12 AQPs bekannt. (Krane und Goldstein, 2007) Sie sind für eine Vielzahl von Regulationsvorgängen (z. B. Zellproliferation, Wasserretention in Epidermis, Auge und Niere, Metabolismus der Adipozyten) verantwortlich (s. Tab. 3). Erkrankungen durch einen AQP-Funktionsverlust oder autoimmune Reaktionen gegen AQPs sind der kongenitale graue Star, der nephrogene Diabetes insipidus oder die Neuromyelitis optica. (Verkmann, 2012)

Tabelle 3Isoformen der Aquaporine (AQP)- Lokalisation, Aufgabe und assoziierte Erkrankungen

Isoform	**Lokalisation**	**Aufgabe**	**Assoziierte Krankheiten**
AQP1	Niere, Erythrozyten, Gehirn, Auge, Lunge, Endothelien, Speicheldrüsen, Uterus, Vagina, Eizellen, Plazenta, Pankreas	Harnkonzentrierung, Blutosmolarität, Liquorproduktion, Augeninnendruck, Linsentransparenz, Zellmigration, Angiogenese, Flüssigkeitstransport	Katarakt, Glaukom, Hirnödem, Atherosklerose, Polyhydramnion, Tumor, Sjögren-Syndrom
AQP2	Niere, Innenohr, Dünn- und Dickdarm	Harnkonzentration, Vasopressin-abhängiger Wassertransport	nephrogener Diabetes insipidus, Enuresis nocturna, kongestive Herzinsuffizienz, Morbus Menière, SIADH
AQP3	Niere, Lunge, Auge, Dünn-/ Dickdarm, Haut, Atemwegsepithel, Harnblase, Erythrozyten	Harnkonzentrierung, Lungen-/Hautbefeuchtung, Zellproliferation und -Migration, Wundheilung	Tumor, Metastasierung, Sepsis, ADPKD, nephrotisches Syndrom
AQP4	Gehirn, Niere, Auge, Lunge	zerebrale Wasserhomöostase, Harnkonzentrierung, Lungenbefeuchtung, Kammerwassersekretion	Hirnödem, Neuromyeliti s optica

Isoform	**Lokalisation**	**Aufgabe**	**Assoziierte Krankheiten**
AQP5	Speichel-/ Tränendrüsen, Auge, Lunge, Dünndarm, Pankreas	Drüsensekretion, Kornea-Wundheilung, Barrierefunktion der Augenlinse	Sjögren-Syndrom, erhöhte Letalität bei Sepsis und ARDS, Weichteilsarkome
AQP6	Niere, Gastrointestinaltrakt, Gehirn, Speicheldrüsen	Säuresekretion, transzellulärer Wassertransport im Darm, möglicherweise Anionenkanal	
AQP7	Adipozyten, Spermien, Niere, Gehirn, Pankreas, Muskeln, Auge	Fettmetabolismus, Spermienbeweglichkeit, renale Glycerol-Reabsorption, Immunantwort dendritischer Zellen, korneale Wundheilung, Blut-Retina-Schranke	Adipositas, Infertilität, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Reizdarmsyndrom
AQP8	Leukozyten, Leber, Pankreas, Niere, Spermien, Plazenta	H_2O_2-Transport, plazentarer Wassertransport	kollagene Colitis, chronische Diarrhoe
AQP9	Leber, Leukozyten, Auge, Gehirn, Plazenta	insulinabhängiger Glycerin-Transport in der Leber, Energiestoffwechsel, Wassertransport, Gluconeogenese	Adipositas, Arsenentgiftung, Hepatozelluläres Karzinom, Leberzirrhose,
AQP10	Gastrointestinaltrakt		Morbus Crohn, Colitis ulcerosa
AQP11	Niere, Auge, Darm, Leber	Nierenentwicklung, Kammerwassersekretion	polyzystische Niere, chron. Nierenversagen bei Diabetes mellitus, Zöliakie

Isoform	**Lokalisation**	**Aufgabe**	**Assoziierte Krankheiten**
AQP12	Pankreas	Wassertransport zur Exozytose der Verdauungsenzyme	Pankreatitis

(Agre et al., 2002, Beitz und Schultz, 1999; Bhattacharjee et al., 2009; Borgnia et al., 1999; Boury-Jamot et al., 2009; Carbrey und Agre, 2009; Chepelinsky, 2009; Delporte, 2009; Engel et al., 2008; Escudero-Hernández et. al, 2020; Gallardo et. al, 2001; Ho et al., 2009; Hua et al., 2019; Ishibashi, 2009; King et al., 2004; Kuebler, 2019; Kwon et al., 2009; LaForenza et al., 2009; Luo et al., 2020; Maeda et al., 2009; Misawa et al., 2008; Morishita et al., 2005; Nielsen et al., 2007; Ohta et. al, 2009; Shimasaki et al., 2018; Sohara et al., 2009; Song et al., 2001; Sonntag et. al, 2019; Takeda und Taguchi, 2009; Tran et. al, 2012; Verkman, 2002, 2009a, 2009b, Verkmann et al., 2008; Wingerchuk et al., 2007; Yasui, 2009; Zador et al., 2009; Zheng und Miao, 2014; Zhu et. al, 2019)

ADPKD = autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung;

ARDS= acute respiratory distress syndrome;

SIADH= Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion.

Die zur Major-intrinsic-protein-(MIP)- Familie gehörenden AQPs haben eine molekulare Masse von 23-34 kDa. (Chaumont et al., 2004) Sie bestehen aus sechs transmembranen Alpha-Helices, die durch fünf Loops miteinander verbunden sind. (Chrispeels und Agre, 1994; Park und Saier, 1996; Reizer et al., 1993) Diese Loops bilden den zytoplasmatischen und extrazellulären Eingang der Pore. (s. Abb. 2)

Im Inneren der Membran bilden AQPs einen sanduhrförmigen Kanal mit ca. 0,3 nm Breite und 2 nm Länge, was ungefähr der Größe eines Wassermoleküls entspricht. (Ternes, 2013) Größere Moleküle können nicht passieren. (de Groot et al., 2001) Beim bidirektionalen Transport der Wassermoleküle werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Molekülen gelöst, dabei reduzieren die Carbonyl-

Sauerstoffgruppen des Kanals als Wasserstoffakzeptoren den Energieaufwand für das Wassermolekül. (Alberts et al., 2017; Wu und Beitz, 2007)

Kleinere Ionen können die AQPs nicht durchqueren, da der energetische Aufwand für das Abstreifen der Hydrathülle zu groß ist. (Alberts et al., 2017) Auch Protonen können aufgrund positiv geladener Aminosäurereste (z. B. Histidin) im Zentrum der Pore den Kanal nicht passieren. So bleibt der für das Membranpotenzial wichtige Protonengradient entlang der Membran erhalten (Fujiyoshi et al., 2002; Ternes, 2013).

Neben den "klassischen", nur für Wasser durchlässigen AQPs (1, 2, 4, 5) gibt es Aquaglycerolproteine (AQP 3, 7, 9, 10), die zusätzlich kleinere, ungeladene Moleküle wie Glycerol transportieren. Das als Zwischenprodukt verschiedener Stoffwechselprozesse entstehende Glycerol wird von der Leber, der Darmmukosa, den Nieren und laktierenden Milchdrüsen zur Synthese von Triacylglyceriden phosphoryliert. Diese spielen bei der Bildung der Lipiddoppelschicht in Zellmembranen eine wichtige Rolle. (Heinrich et al., 2014) Weiter gibt es AQPs, die für Harnstoff, Nitrat, Ammoniak, H2O2 sowie Arsen-, Silizium und Antimonsalze permeabel sind. (Bienert et al., 2007; Hara-Chikuma, 2008; Verkmann 2012; Wu und Beitz, 2007; Yasui und Hazama, 1999). Eine Gruppe, deren Funktion aktuell nicht vollständig bekannt ist, sind die "unorthodoxen" AQPs 6, 8, 11 und 12 dar. (Rojek et al., 2008, Verkmann, 2002)

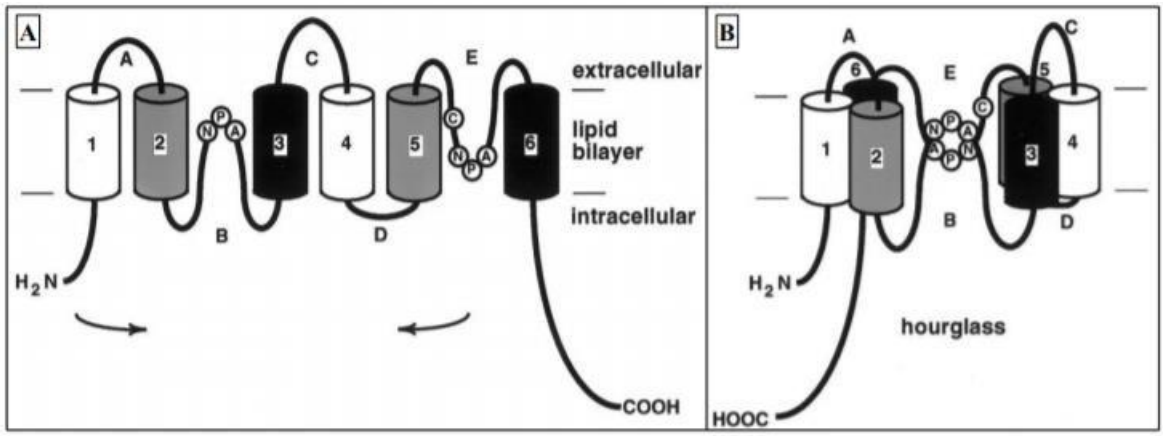

Abbildung 2 allgemeines Strukturmodell der Aquaporine, nach Jung et al., 1994

1.7.1 Aquaporin 1

Aquaporin 1 ist ein kleines aus 269 Aminosäuren bestehendes Protein, das sich in der Zellmembran zu Tetrameren zusammenlagert. (Denker et al., 1988, Preston und Agre, 1991) Das Monomer besteht aus sechs alpha-helikalen Transmembrandomänen, die durch fünf Loops miteinander verbunden sind. (Jung et al., 1994) Die hochkonservierten Sequenzen der Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin in den B- und C-Loops sind für die charakteristische Sanduhrform verantwortlich. Sie tragen zur Stabilität bei und bedingen die Wasserselektivität der Poren. (Cheng et al., 1997; Jung et al., 1994; Walz et al., 1997) Die Richtung des energieunabhängigen Wasserflusses wird durch den osmotischen Gradienten bestimmt und erfolgt bidirektional. (Reizer et al., 1993)

AQP1 spielt für die Regulation des intraokularen Drucks eine zentrale Rolle. Es wird wie AQP 4 in den Ziliarfortsätzen und dem trabekulären Geflecht des menschlichen Auges exprimiert, welches die Produktion und den Abfluss des Kammerwassers steuert. (Patil et al, 1997; Zhang et al., 2002) Bei einem gestörten Abfluss kommt es durch Erhöhung des Augeninnendrucks zum Glaukom.

Zahlreiche Tumorentitäten (z. B. Gallengangs-, Blasen-, Mamma-, Lunge-, Zervix-, Kolon- und Prostatakarzinom, zudem Krebserkrankungen des Nasopharynx und des Gehirns) weisen eine AQP1-Überexpression auf. Diese Überexpression beschleunigt die Migration von Tumorzellen. Als Mechanismus wird die Induktion eines osmotischen Gradienten an der apikalen Seite der Zellen durch einen AQP-1-bedingten Wassereinstrom vermutet. Dies führt zu einer Ausdehnung der Plasmamembran und durch eine nachfolgende Repolymerisierung des Aktin-Skeletts zur Stabilisierung. Durch gezielte AQP1-Hemmung kann die Invasion von Tumorzellen in normales Gewebe gehemmt werden. (Tomita et al., 2017)

Bei der polyzystischen Lebererkrankung (PCLD) wurde eine erhöhte AQP1-Expression in den zystisch veränderten Cholangiozyten und eine Korrelation zwischen der AQP-Expression und der Zystengröße detektiert, was neue therapeutische Möglichkeiten eröffnet. (Li et al., 2016)

In der Niere sind mehrere AQP-Subtypen an der Harnkonzentration beteiligt. AQP1 wird im proximalen Tubulus, im absteigenden Schenkel der Henleschen Schleife und dem Endothel der Vasa recta exprimiert. Bei AQP1-Knockout-Mäusen veränderte sich – trotz der verringerten Wasserdurchlässigkeit des Nierenepithels – die Organmorphologie, Konstitution und Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf den Wildtyp nicht. Bei Wasserverlust reagierten die Knockout-Mäuse bereits nach 36 Stunden mit Gewichtsverlust, Anstieg der Serum- und Urinosmolalität, Dehydrierung und Apathie, wohingegen die Wildtyp-Mäuse in der Lage waren, den Harn zu konzentrieren und dadurch die Osmolalität in Blut und Urin konstant zu halten. (Ma et al., 1998)

AQP1-Kanäle sind durchlässig für Stickstoffmonoxid (NO). Sie liegen in der Lipiddoppelschicht von Membranen vor und erleichtern den Einstrom von NO in die Zelle. Die NO-Konzentration reguliert über die Dilatation von Gefäßen den Blutdruck, im zentralen Nervensystem wirkt NO als Neurotransmitter. In der Niere beeinflusst NO über die Ausscheidung von Wasser und Natrium ebenfalls die Regulation des Blutdrucks. In der Leber führt die Anwesenheit von NO zur Neutralisierung freier Radikale und einer Verbesserung der Perfusion. AQP1 wird auch in den Pneumozyten der Alveolen exprimiert. (Herrera et al, 2006)

Bei der Induktion einer 24-stündigen Hypoxie wurde in Lungenkapillaren von Ratten eine erhöhte AQP1- und AQP3-Expression beobachtet. Damit lässt sich sagen, dass die AQP-Expression durch zellulären Stress gesteigert wird. (Echevarría et al., 2007) Studien an Mäusen belegen einen Zusammenhang zwischen einer verminderten AQP1- Expression und einer verminderten Flüssigkeitsrückresorption im alveolären Endothel der Lunge. Die AQP 1- Synthese wird durch Glukokortikoide gesteigert. Ein Anstieg der AQP1-Expression (stimuliert durch Dexametason) trägt zur Resorption eines Lungenödems bei. (Zhang et al., 2009)

Im Myokard reguliert AQP1 den Wasserdurchfluss im Endothel und spielt somit bei Elektrolytverschiebungen und einer daraus resultierenden Hyperosmolarität des Plasmas eine wichtige Rolle. In Mäusen ließ sich die Expression der glykosylierten Fraktion des kardialen AQP1 durch die Injektion einer hyperosmolaren Lösung steigern. (Rutkovskiy et al., 2012a) Diese Erkenntnisse können beispielsweise für die Sepsis-Therapie von Bedeutung sein.

AQP 1 ist der einzige Wasserkanal, der konstitutiv in kardialem Gewebe aller bisher untersuchten Säugetierarten exprimiert wird. Während der Embryonalentwicklung wird AQP1 in den Klappen und Septen des Herzens synthetisiert, aber auch in den glatten Muskelzellen der Kapillaren, wo es den Wasserfluss zwischen den Kapillaren und dem Interstitium reguliert. Bei ischämischen Ereignissen verringert sich die AQP1-Expression. Vermutlich steht ischämischen Zellen für die mRNA- Synthese nicht mehr ausreichend Energie zur Verfügung. Aufgrund des verringerten Wassertransports entwickelt sich ein Gewebsödem. (Rutkovskiy et al., 2013a) Therapeutisch lässt sich über eine Modulation der AQP 1-Expression die Entwicklung von Gewebsödemen möglicherweise inhibieren.

1.7.2 Aquaporin 3

Als Aquaglycerolprotein ist AQP 3 für Wasser und Glycerol durchlässig und zählt damit wie AQP 7, 9 und 10 zur Familie der Aquaglycerolproteine. AQP3 wird unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen basolateralen Membranen von Epithelgeweben synthetisiert. Wie andere AQPs besteht auch AQP3 aus sechs alpha-helikalen Domänen, die über fünf Loops miteinander verbunden sind. Die Pore wird durch die Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin gebildet. (Marlar et al., 2017)

AQP 3 spielt für die Kanzerogenese und Metastasierung eine entscheidende Rolle. Bei Hauttumoren tritt im Stratum Corneum von Keratinozyten der Epidermis eine erhöhte AQP3-Konzentration auf. AQP 3-Knockout-Mäuse sind resistent gegen diese Tumore. Eine Überexpression korreliert mit einer verschlechterten Prognose bei Brust-, Ösophagus-, Magen- und Kolonkarzinomen. Vermutlich induzieren Östrogene und Epidermal growth factor (EGF) die AQP 3- Expression, wodurch die Zellmigration der neoplastischen Zellen gesteigert wird. Diese sind zwar keine Transkriptionsfaktoren, doch konnte in einer Studie mit östrogenrezeptor-positiven Tumorzellen eine Hochregulation der AQP3-Synthese beobachtet werden (Marlar et al., 2017)

AQP3 beeinflusst die Elastizität und den Feuchtigkeitszustand der Haut. Keratinozyten von AQP 3- Knockout- Mäusen zeigen aufgrund des reduzierten Glycerolgehaltes des Stratum corneum eine beeinträchtigte Barrierefunktion und verlangsamte Lipidbiosynthese. Da Glycerol zur Rückresorption von Wasser beiträgt, verschlechtert sich der Hydratationszustand und die Elastizität, wodurch sich in diesen Tieren die Wundheilung im Vergleich zu Wildmäusen verzögert abläuft. (Hara und Verkmann, 2003)

Weiter wirkt AQP 3 antiapoptotisch: Zellen des Nucleus pulposus in Ratten wurden oxidativem Stress ausgesetzt, wodurch es normalerweise zu Zellschäden bis hin zum Absterben der Zelle kommt. Eine erhöhte AQP 3-Expression verringerte den Gehalt von freien Radikalen in der Zelle und hemmt den p38-mitogen activated protein (MAP)-Kinase-Signalweg, der zur Apoptose führt. (Xu et al., 2018)

Für die Funktion des Immunsystems spielt AQP3 eine wichtige Rolle. Damit eine effektive Immunantwort gegen Viren, Bakterien, Parasiten und Tumorzellen stattfinden kann, ist die Antigen-Präsentation auf MHC-ÎI-Komplexen an CD-8+ T-Zellen erforderlich. Vermutlich werden Antigene, die von den Phagozyten aufgenommen werden, zum endoplasmatischen Retikulum und von dort zu den MHC-II-Komplexen an die Zellmembranen transportiert. Jetzt können zytotoxische CD8+-Zellen diese Antigene erkennen, binden und die Zellen unschädlich machen. Die Rolle von AQP3 besteht in seiner Funktion als H2O2-Kanal und leitet Wasserstoffperoxid in die inneren Kompartimente der Zelle. Dadurch wird der Antigentransport vom ER zu den MHC-I-Molekülen verbessert. Wird die Expression von AQP3 gesteigert, beschleunigt sich der Transport und die Immunantwort setzt früher ein. (Nalle et. al, 2020) Die Funktion der AQP 3- Expression in den Kardiomyozyten ist noch nicht geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. (Rutkovskiy et al., 2013b)

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Identifikation einer Hypothermie ist im forensischen Alltag anspruchsvoll und in einigen Fällen nur als Ausschlussdiagnose möglich. Oftmals gelingt die Diagnose nur durch die Kombination der Auffindesituation, der Vorgeschichte und den bei der Obduktion erhobenen mikro- und makroskopischen Befunden.

Bislang gibt es nur wenige Forschungen zu AQPs, die für die Rechtsmedizin relevant sind. Hierbei handelt es sich um Studien zur AQP4-Expression beim Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) von Eidahl et al. (2021) und Opdahl et al. (2010) sowie eine weitere Studie zur AQP3-Expression als Vitalitätsmarker bei mechanischen oder thermischen Hautverletzungen. (Ishida et al., 2018)

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob es beim Tod durch Hypothermie zu einer gesteigerten Expression von HSPs und AQPs kommt. Hierfür wurde die HSP- und

AQP- Expression in Gewebeproben aus 48 Herzen, 43 Lebern und 46 Nieren von an Hypothermie Verstorbenen (Hypothermiekollektiv) mit an verschiedenen Todesursachen exklusive der Hypothermie Verstorbenen verglichen (Kontrollkollektiv). Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen makroskopisch erhobenen Befunden (Wischnewski-Flecken, Kälteerytheme der Haut) und Expression der HSPs und AQPs besteht und ob es einen Zusammenhang zwischen dem BMI und der Proteinexpression gibt.

2. Material und Methoden

2.1 Hypothermiekollektiv

Das Hypothermiekollektiv bestand aus 51 Todesfällen durch Hypothermie, die zwischen 2006 und 2016 im Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn obduziert wurden.

Alle notwendigen Informationen wurden den entsprechenden Sektionsprotokollen entnommen. Dokumentiert wurden das Geschlecht, das Lebensalter zum Zeitpunkt des Todes, die Auffindesituation, die Größe, das Gewicht, die Blutalkohol-Konzentration zum Zeitpunkt der Obduktion sowie die Todesart und -ursache.

Das Kollektiv bestand aus 27 (52,94 %) männlichen und 24 (47,05 %) weiblichen Verstorbenen. Der Altersdurchschnitt lag bei 65,70 Jahren, die Spanne reichte von 9-97 Jahren.

Der durchschnittliche BMI betrug 24,73 kg/m2 bei einer Spanne von 14,06- 48,06 kg/m2.

Weiter wurden äußere und innere Anzeichen zur Identifikation der Hypothermie dokumentiert, darunter Kälteerytheme und Wischnewski-Flecken.

Leichen, die Fäulnisveränderungen aufwiesen, wurden aus dem Hypothermiekollektiv entfernt, um die Ergebnisse nicht durch Autolyse zu verfälschen.

Zusätzlich wurden routinemäßig Gewebeproben aus den Lebern, Herzen und Nieren der Verstorbenen entnommen und histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet.

Das kritische Gewicht des Herzens betrug 500 g. Der Anteil an Herzen, die über diesem Gewicht lagen, wurde quantitativ erfasst.

In einigen Fällen kam es durch die Fragilität des Gewebes beim Zuschneiden am Mikrotom zu einer Zerstörung der Strukturen. Diese Präparate konnten nicht für die Färbungen verwendet werden. Daher besteht das Hypothermiekollektiv aus 48 Herzproben, 43 Leberproben und 46 Nierenproben.

2.2 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv bestand aus 48 Verstorbenen, darunter 24 männliche (52,08 %) und 23 weibliche (47,91 %) Leichen. Dabei handelte es sich um Fälle, die im Jahr 2009 im Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn obduziert wurden. Der Altersdurchschnitt lag bei 58,91 Jahren, die Spanne reichte von 7-100 Jahren.

Der durchschnittliche BMI betrug 26,16 kg/ m2 bei einer Spanne von 17,63- 40,15 kg/ m2.

Bei einem Fall mit weitgehender postmortaler Destruktion ließen sich das Alter, das Gewicht und die Größe des Verstorbenen nicht bestimmen.

Auch im Kontrollkollektiv wurden das Geschlecht, das Lebensalter zum Zeitpunkt des Todes, die Größe, das Gewicht, die Blutalkohol-Konzentration zum Zeitpunkt der Obduktion sowie die Todesart und -ursache ermittelt.

Die vielfältigen Todesursachen des Kontrollkollektivs enthielten verschiedene internistische Erkrankungen, aber auch Intoxikationen mit Alkohol / Drogen. (s. Tab. 5)

Ausschlusskriterien für diese Gruppe waren Fäulnis und fortgeschrittene Verwesungsprozesse. Außerdem wurden keine Todesfälle, bei denen eine Hypothermie möglicherweise zum Tod beigetragen haben könnte, in das Kollektiv aufgenommen.

Bei der Gewinnung der immunhistochemischen Proben kam es auch beim Kontrollkollektiv zu Gewebezerstörungen. Für die immunhistochemischen Analysen bestand das Kontrollkollektiv daher aus 45 Herzproben, 43 Leberproben und 48 Nierenproben

Tabelle 4Übersicht über Hypothermie- und Kontrollkollektiv, Fallzahlen, Geschlecht, Lebensalter, BMI und Anzahl der Organproben

	Hypothermiekollektiv	**Kontrollkollektiv**
Anzahl der Fälle	51	48
Geschlecht (M/W)	27/24	24/23
Durchschnittliches Lebensalter (Jahre)	65,70	58,91

	Hypothermiekollektiv	**Kontrollkollektiv**
Durchschnittlicher BMI (kg/m$^{2)}$	24,73	26,16
Anzahl der Herzproben	48	45
Anzahl der Leberproben	43	43
Anzahl der Nierenproben	46	48

M= männlich, W= weiblich, BMI= Body Mass Index

2.3 Datenerhebung für die Immunhistochemie

2.3.1 Asservierung / Fixation

Durch die Fixierung der entnommenen Organproben werden autolytische Prozesse des Gewebes aufgehalten. Die beiden Obduktionen entnommenen Gewebeproben wurden in Neutralphosphat-gepuffertem Formaldehyd fixiert, welches die enthaltenen Proteine denaturiert und vernetzt. Im nächsten Schritt müssen die Proben entwässert und paraffingängig gemacht werden. Dies wird durch aufsteigende Alkoholreihen und Xylol als Zwischenmedium erreicht. Zum Schluss werden die Proben in Paraffin eingebettet, um die Stabilität des Gewebes für den Schnittvorgang zu erhalten. Die hier verwendeten Proben wurden mithilfe des Autotechnicon (Modell "Citadell 1000", Firma Shandon, Walldorf) aufbereitet, entwässert und in Paraffin eingebettet.

Danach wurden von den Gewebeblöcken am Mikrotom (Modell Jung HN40, Firma Leica, Nussloch) Schnitte mit einer Dicke von 2-4 µm angefertigt, auf handelsübliche Objektträger (z. B. Histobond, Firma Superior, Marienfeld) aufgebracht und im Anschluss für mindestens 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank (Gerätetyp B12, Heraeus Instruments, Hanau) getrocknet.

2.4 Färbungen

2.4.1 Hämatoxylin-Eosin- (HE)

Die histopathologische Diagnostik erfolgte für die Proben beider Kollektive mittels HE-Färbung. Dabei handelt es sich um eine standardmäßig eingesetzte Methode. Mit HE-

Färbungen lassen sich die Architektur verschiedener Gewebe und Pathologien wie Entzündungen oder degenerative Veränderungen gut darstellen.

Durch die Verwendung von zwei Farbstoffen sind die Strukturen der Zelle besser voneinander abgrenzbar. Die Zellkerne färben sich im ersten Schritt durch das Hämatoxylin blau-violett bis schwarz. Im nächsten Schritt erfolgt eine Gegenfärbung mit einem Xanthen-Farbstoff (z. B. Eosin G, Eosin B Erythrosin B), wodurch sich das Zytoplasma, aber auch Erythrozyten, Keratin oder Kollagen rosa anfärbt.

2.4.2 Immunhistochemische Färbung

Bereits 1941 beschrieben Coons et al. den Nachweis zellulärer Antigene in Gewebsschnitten mittels Immunfluoreszenz. Diese Arbeit war der Beginn der Immunhistochemie.

Die Immunhistochemie beruht auf der Markierung zellulärer Proteine (=Zielantigen) in Gewebeproben mit einem spezifischen Antikörper und dessen Detektion mit Nachweisreagenzien. Die Gewebsschnitte werden zu diesem Zweck mit Antikörpern behandelt, die ein spezifisches Epitop im Gewebe erkennen und daran binden. Sobald diese Bindung eingegangen ist, wird sie mit einer farbigen biochemischen Reaktion nachgewiesen, z. B. durch Lichtmikroskopie oder Fluorochrome mit ultraviolettem Licht. (Ramos-Vara, 2005)

Unterschieden werden die direkte und die indirekte Methode. Bei der direkten Methode ist der das Antigen bindende Antikörper modifiziert und wird mittels Farbreaktion nachgewiesen (z. B. Substrat + Chromogen). Der Vorteil dieser Methode ist, dass nur ein Antikörper benötigt wird und das Ausmaß unspezifischer Bindungen limitiert. Der Nachteil besteht darin, dass die Signalintensität bei Gewebsschnitten mit einer geringen Antigendichte zu schwach ist. Zur Verbesserung der Sensitivität wurde die indirekte Methode entwickelt. Dabei bindet an einen Antigen-spezifischen primären Antikörper ein sekundärer markierter Antikörper. Da mehrere sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden, verstärkt sich das Signal. Der Nachteil dieser Methode ist das potentielle Auftreten unspezifischer Bindungen, wodurch Hintergrundsignale verstärkt werden. (Ramos-Vara, 2005)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Avidin-Biotin-Methode ist eine indirekte immunhistochemische Methode. Sie beruht auf der Affinität des Proteins Avidin zu dem wasserlöslichen Vitamin Biotin. Avidin kann bis zu vier Moleküle Biotin binden (Boenisch, 2000). Bei dem Verfahren werden Komplexe aus Sekundärantikörper und Biotin sowie Avidin und biotinylierter Peroxidase eingesetzt. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Biotin bindet an Avidin. Die Detektion des Antigens erfolgt durch den Umsatz eines Chromogensubstrats durch die an das Avidin gekoppelte Peroxidase (HSU, 1981, Boenisch, 2000). Durch die Bindung des positiv geladenen Avidins an negativ geladene Gruppen werden jedoch falsch-positive Signale erzeugt. Daher wird bei der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) Streptavidin, das im Gegensatz zu Avidin eine neutrale Ladung besitzt, verwendet. (Ramos-Vara, 2005)

Tabelle 5 Herkunft der Positivkontrollen für die immunhistochemische Analyse der Aquaporine (AQP) und Heat-shock-Proteine (HSP)

Färbung	**Gewebe**
AQP1	Niere
AQP3	Niere
HSP27	Haut
HSP60	Niere
HSP70	Haut

Tabelle 6 Verwendete Erst- und Zweitantikörper für die immunhistochemische Analyse der Aquaporine (AQP) und Heat-shock-proteine (HSP)

Färbung	**Erstantikörper**	**Verdünnung**	**Zweitantikörper**	**Anfärbung**
HSP27	Mouse anti-heat shock protein 27 monoclonal antibody, NCL-HSP27, abcam	1:20	LSAB2 System-HRP- Kit, Code K0675, von Dako	HSP27

Färbung	Erstantikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Anfärbung
HSP60	Mouse anti-HSP60 clone 1, Sigma Aldrich	1:400	LSAB2 System-HRP- Kit, Code K0675, von Dako	HSP60
HSP70	Heat shock protein 70 mouse monoclonal antibody, NCL-HSP70, abcam	1:25	LSAB2 System-HRP- Kit, Code K0675, von Dako	HSP70
AQP1	mouse monoclonal antibody, abcam	1:100	Dako Envision+, Dual Link System, Code K4063	AQP1
AQP3	rabbit polyclonal antibody, abcam	1:500	Dako Envision+, Dual Link System, Code K4063	AQP3

HRP = Horseradish Peroxidase, LSAB = Labeled-Streptavidin-Biotin

2.5 Histologische Beurteilung der Präparate

Bei der histologischen Untersuchung wurden vordergründig folgende Gewebestrukturen angefärbt:

- Herz: Fibrozyten, Gefäße, Myozyten
- Leber: Hepatozyten, intrahepatische Cholangiozyten, peribiliäre Kapillaren
- Niere: Gefäße, Glomeruli, Tubuli

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden semiquantitativ in Anlehnung an Preuss et al. (2008) mikroskopisch ausgewertet. Pro Organ wurden fünf Präparate hergestellt. Hierbei wurden jeweils 10 Gesichtsfelder pro Präparat nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und bei 400-facher Vergrößerung beurteilt. Die Anfärbung der zellulären

Strukturen spiegelt das Ausmaß der Expression wider. Der Grad der Färbung wurde in den Geweben aus Herz, Leber und Niere in Relation zu den nicht angefärbten Strukturen bewertet. Die Ergebnisse der zehn Gesichtsfelder wurden zu einem gemeinsamen Ergebnis zusammengefasst.

Die Schnitte wurden in 400-facher Vergrößerung fotografiert (BX 40, Firma Olympus, Hamburg). Zunächst wurde ein Weißabgleich durchgeführt, um die Kontraste der Farben deutlicher hervorzuheben. Nun wurden die vorher per Zufallsprinzip ausgewählten Gesichtsfelder einzeln fotografiert und gespeichert. Im nächsten Schritt wurden die Fotos mithilfe der Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Maryland, USA) ausgewertet. Beurteilt wurden die Anzahl der angefärbten Strukturen pro Gesichtsfeld und die Intensität der Färbung:

- Beurteilung der Häufigkeit des Auftretens AQP- bzw. HSP- positiver Organe
- Dies entsprach dem Anteil der Patienten mit positiven immunhistochemischen Befunden.
- Beurteilung des prozentualen Anteils der angefärbten Strukturen
- Zunächst wurden die angefärbten Strukturen (Pixel) pro Gesichtsfeld in Relation zur Gesamtzahl aller anfärbbaren Strukturen (Pixel) gesetzt. Dadurch wurde die prozentuale Anfärbbarkeit bestimmt.
- Beurteilung der Farbintensität der angefärbten Strukturen
- Alle Fotos lagen als 8-bit-Graustufenbilder vor, d.h. die Farbwerte der einzelnen Pixel können 256 verschiedene Werte annehmen. Zur Auswertung der Farbintensität wurden hier Schwellenwerte von 120-130 bestimmt, die von der Software als region of interest (ROI) erkannt und analysiert wurden. Alle Pixel mit Farbwerten außerhalb dieses Bereichs wurden nicht bearbeitet. Im Anschluss daran wurde der Mittelwert der verschiedenen Farbintensitäten eines Bildes berechnet und zu einem Gesamtergebnis zusammengefasst. Die Intensität wurde als negativ, niedrig positiv, positiv und hoch positiv klassifiziert (s. Abb. 3)

Bei der HSP-Auswertung musste eine artifizielle Randfärbung berücksichtigt werden, da auch diese Signale Farbwerte innerhalb des definierten Bereichs aufwiesen. Deshalb gingen diese Gesichtsfelder nicht in die Beurteilung mit ein, um eine Verfälschung des Ergebnisses zu vermeiden.

2.6 Statistische Auswertung

Bei der Auswertung der Parameter aus den zehn Gesichtsfeldern wurden die Mittelwerte + Standardabweichung berechnet. Für die weitere statistische Auswertung wurde der Mann- Whitney-U- Test für verwendet. Mit diesem nicht-parametrischen Testverfahren werden die Ränge einzelner Messwerte miteinander verglichen. Voraussetzungen zur Verwendung des Tests sind zwei unabhängige Stichproben mit ordinalskalierten Merkmalen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

2.7 Färbeprotokoll der HE- Färbung

Die Hämatoxylin- Eosin- Färbung ist eine der am Weitesten verbreiteten Färbungen in der Histologie. Sie ermöglicht die Differenzierung verschiedener Gewebestrukturen eines mikroskopischen Präparats und dient auch als Übersichtsfärbung vor weiteren Verfahren wie beispielsweise den hier angewandten immunhistochemischen Färbungen. Hämatoxylin ist ein Stoff aus dem mexikanischen Blauholzbaum und wird an der Luft zu Hämatein oxidiert, welches alle sauren oder basophilen Strukturen eines Gewebes blau anfärbt, z. B. DNA, Zellkerne, Ribosomen und das endoplasmatische Retikulum. Im zweiten Schritt der Färbung werden mit dem synthetischen Farbstoff Eosin alle basischen bzw. azidophilen Zellstrukturen rot angefärbt wie z. B. Kollagen, Mitochondrien, Keratin und Proteine des Zytoplasmas.

Das Färbeprotokoll sieht im ersten Schritt eine Entparaffinierung und Dehydrierung der Gewebeproben vor. Dafür werden die Objektträger für 20 Minuten in Xylol als Zwischenmedium eingestellt und anschließend jeweils für zehn Sekunden in absteigender Alkoholreihe in Isopropanol geschwenkt. (2x 100%, 2x 96%, 2x 70% und 1x 50%) Als nächstes werden die Gewebeschnitte in Aqua demineralisata gespült, um mögliche Rückstände zu entfernen. Dann erfolgt die Kernfärbung der Schnitte in Hämatoxylin für 15- 20 Minuten. Im Anschluss werden die Objektträger in fließendem Leitungswasser

gespült („Bläuen“), damit ausschließlich die Zellkerne angefärbt bleiben. Im nächsten Schritt wird die Gegenfärbung der Gewebeproben mit Eosin durchgeführt, um das Zytoplasma zu färben. Sie benötigt ca. 30- 60 Sekunden mit Eosin 0,5%. Auch danach werden alle Objektträger mit Aqua demineralisata gespült. Im Anschluss daran werden die Proben mittels aufsteigender Alkoholreihe wieder rehydriert und für jeweils zehn Sekunden in Isopropanol geschwenkt. (2x 70%, 2x 96%, 2x 100%) Als letztes werden die Präparate mit Aquatex als Eindeckmedium und einem Deckglas bedeckt. („Eindecken“)

2.8 Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbungen

Das Ergebnis einer immunhistochemischen Färbung hängt maßgeblich von der Durchführung und Reihenfolge der einzelnen Schritte ab. So ist die Qualität der Gewebefixierung der erste wichtige Faktor des Gesamtprozesses. Die Fixierung dient dazu, den Zustand der Gewebe möglichst unverändert zu erhalten und postmortale Prozesse wie Zellschwellung oder -schrumpfung aufzuhalten. Die Fixierung in Formalin hat den Nachteil, dass durch Methylbrückenbildung die Proteinstruktur verändert und Epitope zerstört werden. Daher wurde hier für die Gewebefixierung neutralphosphat-gepuffertes Formaldehyd verwendet, welches zur geringeren Ausbildung von Methylbrücken führt.

2.8.1 Entparaffinierung und Vorbehandlung zur Demaskierung der Antigene

Die in Paraffin eingebetteten Präparate mussten zur weiteren Behandlung zunächst entparaffiniert werden. Hierfür wurden die Objektträger mit den Gewebeproben für 20 Minuten in Xylol als Zwischenmedium eingestellt. Im nächsten Schritt erfolgte die Entwässerung über eine absteigende Alkoholreihe mit Ethanol (2x 100%, 2x 96%, 2x 70% und 1x 50%). Dieser Vorgang führt zur Auflösung des Paraffins, so dass nur das eingebettete Organ übrig bleibt. Da sich das Färbeverhalten bei autolytischen Prozessen verändert und somit die Ergebnisse beeinflusst, wurden keine Organproben von fäulnisveränderten Verstorbenen analysiert.

Zur Überprüfung der Methode und zur Vermeidung von Fehlinterpretationen (falsch-positive Befunde) wurden bei jedem Färbungsvorgang Positivkontrollen mitgeführt. Die

Positivkontrollen für die AQPs und HSPs entstammen aus unterschiedlichen Geweben (s. Tab. 5).

Da die Organe zur Konservierung in neutralphosphat- gepuffertem Formaldehyd fixiert waren, lagen die Antigene nicht frei vor und mussten zunächst zugänglich gemacht werden, um falsch-negative oder abgeschwächte Befunde zu vermeiden. Durch eine Behandlung der Gewebeproben mit feuchter Hitze ist die Formaldehyd- induzierte Veränderung der Epitope reversibel. Zu diesem Zweck wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten mit Zitratpuffer pH 6,0 bei 600 W in der Mikrowelle gekocht. Danach mussten sie mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur auskühlen, da diese Phase der entscheidende Schritt in der Rekonstituierung der Epitope ist. Im letzten Schritt wurden die Proben sorgfältig mit TRIS- Puffer (1:10) gespült. Nun lagen die Antigenbindestellen frei und die Antikörper konnten aufgetragen werden.

2.8.2 LSAB- Methode

Die immunhistochemische Färbung der HSPs benötigt zur Durchführung zwei Tage. Nach der oben beschriebenen Entparaffinierung und Vorbehandlung der Gewebeproben wurden jeweils vier Tropfen AB- Schweineserum zur Blockierung unspezifischer Proteine (Verdünnung 1:5) aufgetragen und abgedeckt in der Inkubationsbox für 20 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden zwei Tropfen des Primärantikörpers (monoklonaler Maus Anti Human Hsp Antikörper) auf jedes Präparat aufgetragen und für 6- 12 Stunden bei 4- 8 °C inkubiert.

Danach wurden die Objektträger für mindestens eine Minute mit frischem TRIS- Puffer (1:10) gespült und im Anschluss zwei Tropfen des Sekundärantikörpers (Biotinmarkierter Ziegen Anti Maus und Anti Kaninchen Antikörper) auf jedes Präparat aufgetragen und diese für 30 Minuten in der Inkubationsbox bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben erneut mit TRIS- Puffer gewaschen. Danach erfolgte das Auftragen von Peroxidase- Blocking- Solution und anschließende Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Dieses Reagenz blockiert die endogene Peroxidase und damit das Auftreten falsch- positiver Signale. Nach der Inkubation wurden die Präparate erneut mit frischem TRIS- Puffer gewaschen und im nächsten Schritt jeweils zwei Tropfen Streptavidin- gebundener Meerrettichperoxidase aufgetragen. Nun wurden die Proben für 30 Minuten in der Inkubationsbox bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Bindung

zwischen Avidin und Biotin möglich war. Im Anschluss daran wurden die Präparate wieder für eine Minute mit frischem TRIS- Puffer gespült. Danach wurden auf jede Gewebeprobe fünf Tropfen AEC- Substrat aufgetragen und in der Inkubationsbox bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Meerrettichperoxidase oxidiert das farblose Chromogen zu einem rot-braunen Farbkomplex. Unter ständiger lichtmikroskopischer Kontrolle wurde die Reaktion bis zum optimalen Färbeergebnis kontrolliert und dann durch Spülen der Präparate in Aqua demineralisata unterbrochen. Im nächsten Schritt wurden die Proben zur Kontrastfärbung des Hintergrunds für 15- 30 Sekunden mit Hämalaun- Lösung (basisches Hämatoxylin) gegengefärbt. Zum Schluss wurden die Präparate für 5- 10 Minuten in kaltem Leitungswasser gebläut und zur Konservierung mit Aquatex als Eindeckmedium mit einem Deckglas bedeckt.

2.8.3 Färbeprotokoll AQP- Färbung

Für die immunhistochemische Färbung der AQPs wurden die Gewebeproben mit dem EnVision+ - Kit der Firma Dako, Hamburg, gefärbt. Die Vorbehandlung umfasst die Entparaffinierung, bei der die Objektträger für 20 Minuten in Xylol eingestellt wurden. Anschließend daran wurden sie über eine absteigende Alkoholreihe mit Ethanol dehydriert. (2x 100%, 2x 96%, 2x 70% und 1x 50%) Danach wurden die Gewebeproben in TRIS- Puffer (1:10 verdünnt) gewaschen. Im nächsten Schritt erhitzte man die Objektträger für 30 Minuten mit Zitratpuffer (pH 6,0) bei 600 W in der Mikrowelle und ließ sie danach für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen. Als nächstes wurden die Proben mit frischem TRIS- Puffer (1:10) gewaschen, um mögliche Rückstände zu entfernen. Danach wurde Peroxidase- Blockingreagenz auf die Objektträger aufgetragen und 20 Minuten einwirken lassen. Im Anschluss daran wurden die Gewebeproben erneut zweimal in frischem TRIS- Puffer (1:10) gespült. Nun konnte der Erstantikörper (mouse monoclonal antibody, abcam (AQP1) bzw. rabbit polyclonal antibody, abcam (AQP3)) in der jeweiligen Verdünnung (s. Tab. 6) aufgetragen werden. Danach wurden die Gewebeproben mit einem Deckglas bedeckt und für 6- 12 Stunden bei 4- 8°C in der Inkubationsbox inkubiert.

Zu Beginn des nächsten Schritts wurden die Präparate sorgfältig für mindestens eine Minute in frischem TRIS- Puffer (1:10) gespült. Als nächstes konnte der Zweitantikörper (Dako Envision+, Dual Link System, Code K4063) aufgetropft werden und die

Objektträger danach für mindestens eine Stunde bei 37°C in der Inkubationsbox inkubiert werden. Im Anschluss daran wurden die Gewebeproben erneut für eine Minute in frischem TRIS- Puffer (1:10) gewaschen. Nun erfolgte das Anfärben des Antigen- Antikörper-Komplexes mit jeweils fünf Tropfen 3- Amino- 9- Ethylcarbazol- (AEC)- Substrat bei Raumtemperatur in der Inkubationsbox. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die Präparate bis zum optimalen Färbeergebnis ständig beobachtet und die Reaktion dann durch Waschen der Objektträger in Aqua demineralisata unterbrochen. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeproben mit Hämalaun nach Meyer für 15- 30 Sekunden gegengefärbt und in fließendem Leitungswasser gespült („Bläuen“), damit nur die Zellkerne angefärbt blieben. Zum Schluss wurden die Präparate mit Aquatex als Eindeckmedium und einem Deckglas bedeckt und konserviert. („Eindecken“)

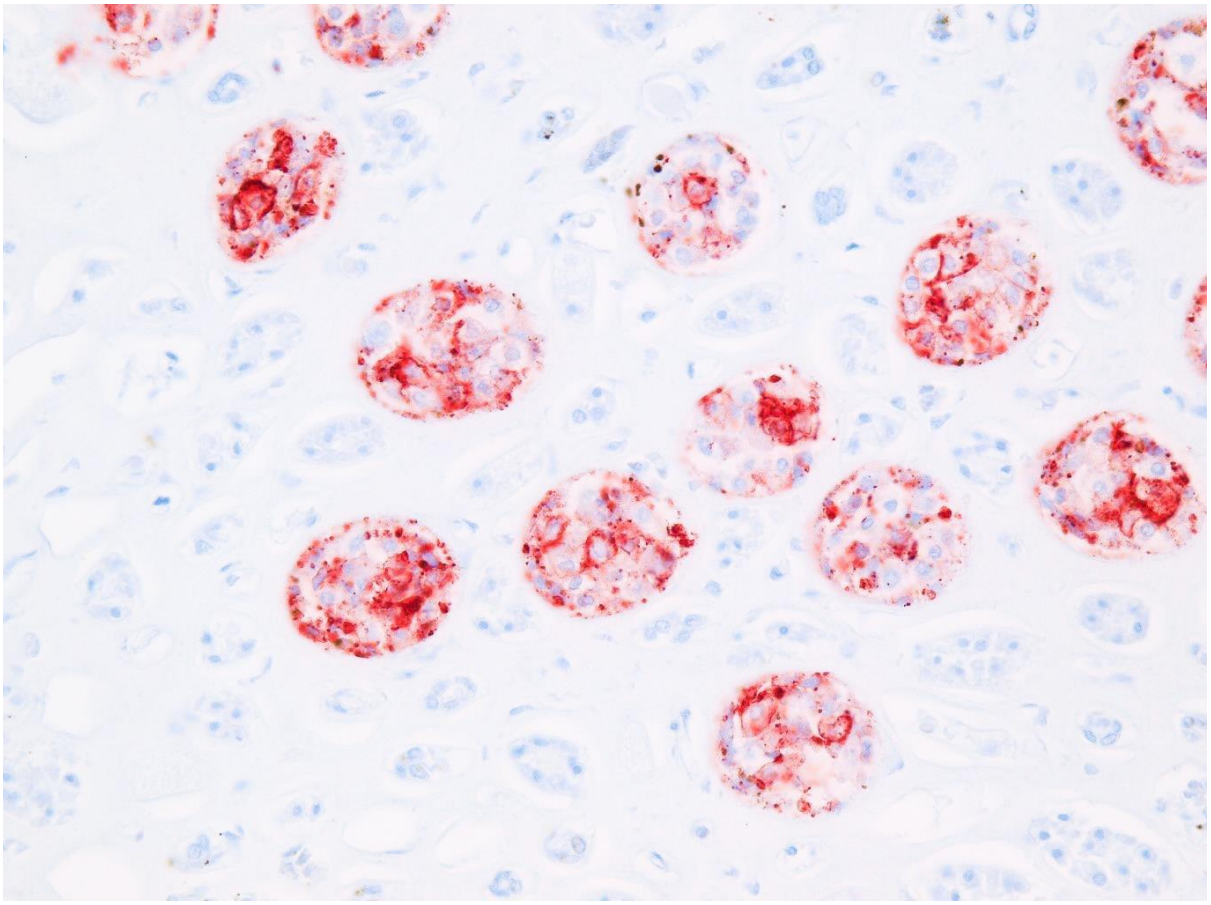

Abbildung 3 Hypothermiekollektiv, AQP3-Expression in der Niere, Intensität „hoch positiv“

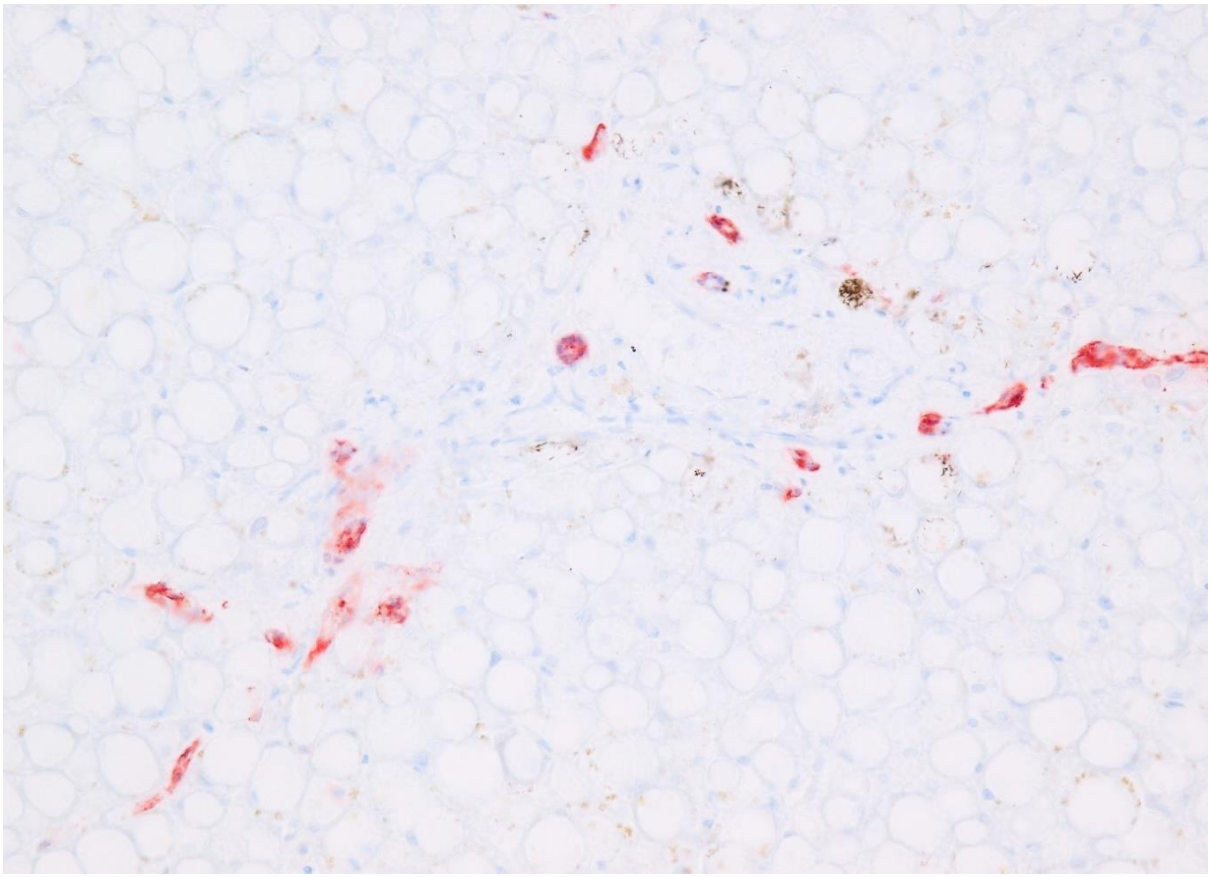

Abbildung 4 Hypothermiekollektiv, AQP1-Expression in der Leber, Intensität „positiv“

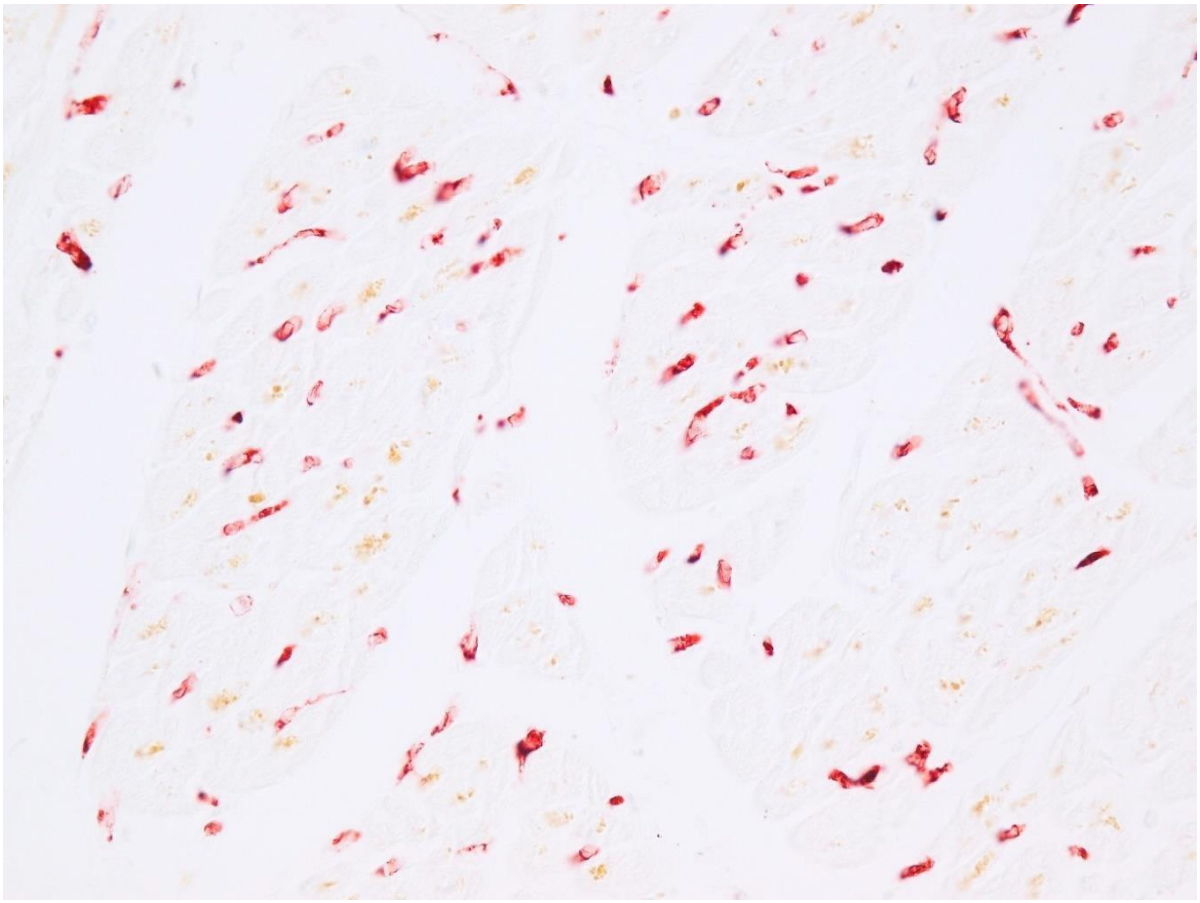

Abbildung 5 Hypothermiekollektiv, AQP-1-Expression des Herzens, Intensität „hoch positiv“

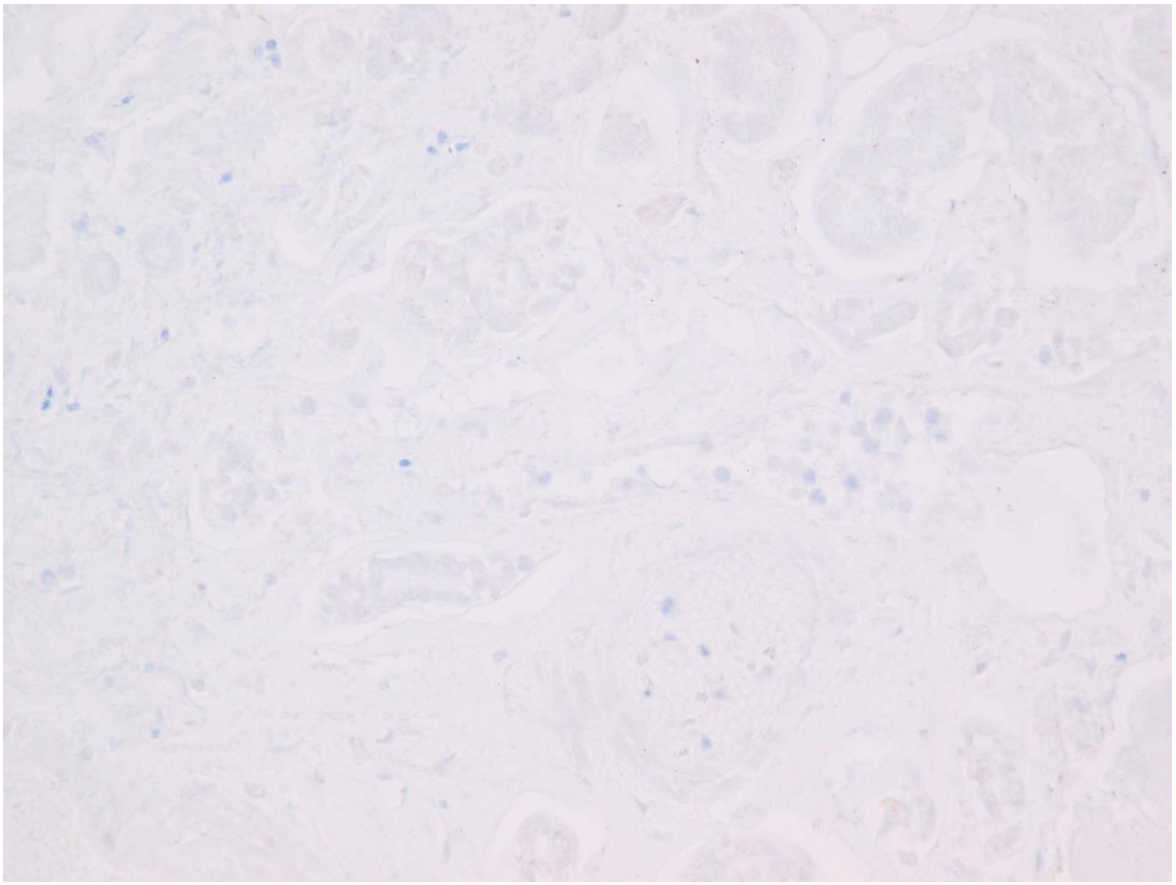

Abbildung 6 Kontrollkollektiv, Niere, HSP-27-Färbung; Intensität „negativ“

3. Ergebnisse

3.1 Geschlecht, Alter und Organgewicht

Das Hypothermiekollektiv umfasste 51 Fälle, darunter 27 (52,94 %) männliche und 24 (47,05 %) weibliche Verstorbene (s. Tab. 7). Das Durchschnittsalter betrug 65,70 Jahre (Spanne 9-97 Jahre). Weite wurde aus der Körpergröße und dem Körpergewicht der Body Mass Index (BMI) errechnet. Die Organgewichte von Herz, Leber und Niere wurden ebenfalls erfasst. Der durchschnittliche BMI betrug 24,73 kg/m2. Das durchschnittliche Gewicht der Herzen betrug 444,92 g (Spanne 91 g- 880 g). Das „kritische“ Gewicht von 500 g wurde in 11 Fällen (21,56 %) überschritten. Das Durchschnittsgewicht der Lebern betrug 1403,01 g, (Spanne 514 g-3580 g) Die Nieren waren im Durchschnitt 130,62 g schwer (Spanne 44 g- 230 g).

Das Kontrollkollektiv bestand aus 48 Todesfällen, die im Jahr 2009 im Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn obduziert wurden und bei denen eine Hypothermie als Todesursache ausgeschlossen werden konnte. Darunter waren 24 männliche (51,06 %) und 23 weibliche (48,93 %) Verstorbene. Hier lag der Altersdurchschnitt bei 58,91 Jahren, (Spanne 7-100 Jahre). Der durchschnittliche BMI betrug 26,16 kg/m2. Das durchschnittliche Gewicht der Herzen betrug 426,80 g (Spanne 115 g -880 g). Im Kontrollkollektiv wurde die kritische Grenze von 500 g Herzgewicht in zwölf Fällen (25,53 %) überschritten. Die Lebern waren im Durchschnitt 1125,95 g schwer (Spanne 590 g-3870 g). Das durchschnittliche Gewicht der Nieren betrug 104,52 g (Spanne 30 g-260 g).

3.2 Hypothermiebefunde im Hypothermiekollektiv

Von den mit einer Hypothermie möglicherweise einhergehenden Befunden wurde das Hypothermiekollektiv auf das Auftreten von Wischnewski-Flecken und Kälteerythemen hin untersucht. Diese Parameter kommen häufig bei Hypothermie vor, fehlen jedoch bei anderen Todesursachen. In 29 Fällen (56,6 %) ließen sich ausschließlich Wischnewski-Flecken bei der Obduktion nachweisen, in drei Fällen (5,8 %) ausschließlich Kälteerytheme. Bei 18 Verstorbenen (35,2 %) wurden sowohl Wischnewski-Flecken als auch Kälteerytheme festgestellt. In einem Fall (1,9 %) fehlten makroskopische Befunde

bei der Obduktion, die die Todesursache „Hypothermie“ absicherten. Hierbei handelte es sich um einen männlichen Verstorbenen, der spärlich bekleidet bei einer Außentemperatur von 1,5 °C in einer Garage aufgefunden worden war, in der er vermutlich einige Zeit gelegen hatte.

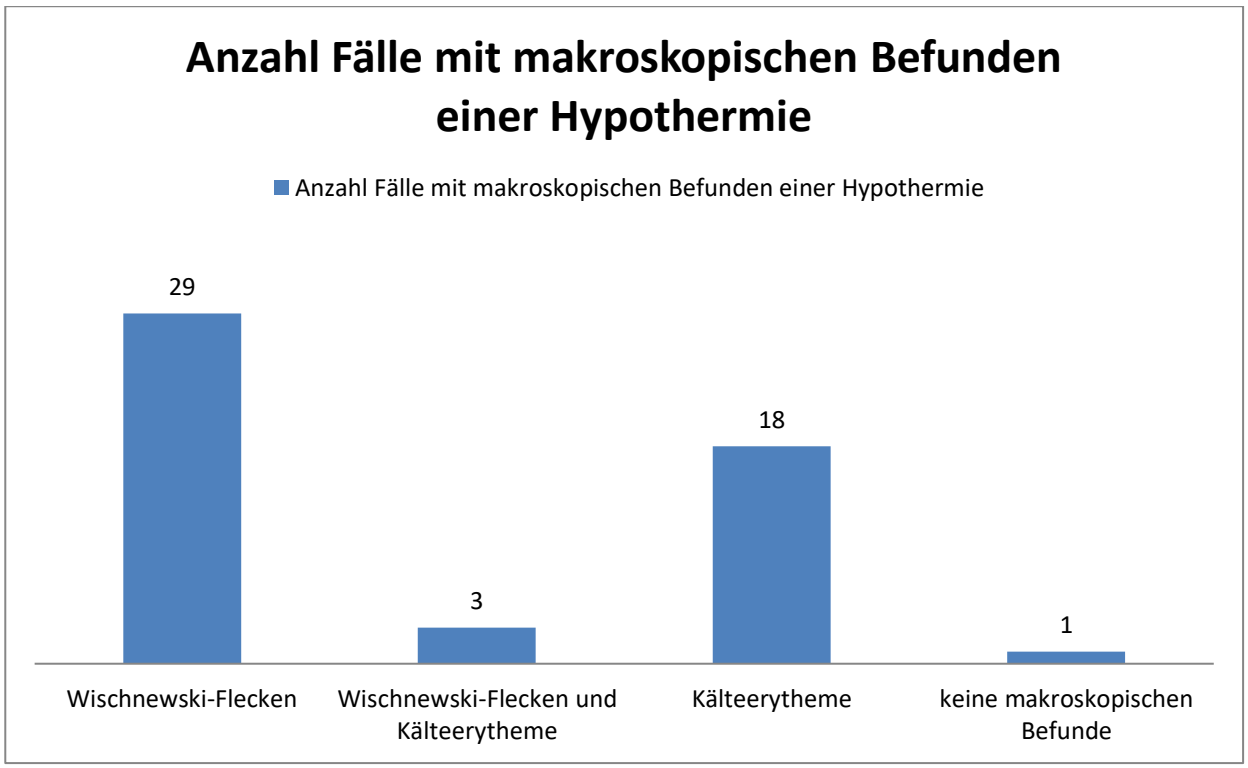

Abbildung 7 Vorliegen makroskopischer Befunde im Hypothermiekollektiv

3.3 Todeszeit nach Jahreszeit in Monaten und Auffindesituationen im Hypothermiekollektiv

Im Hypothermiekollektiv waren 33 Fälle (64,7 %) in den Wintermonaten November bis Februar verstorben, 18 Fälle (35,3 %) verteilten sich auf das restliche Jahr. (s. Abb. 8).

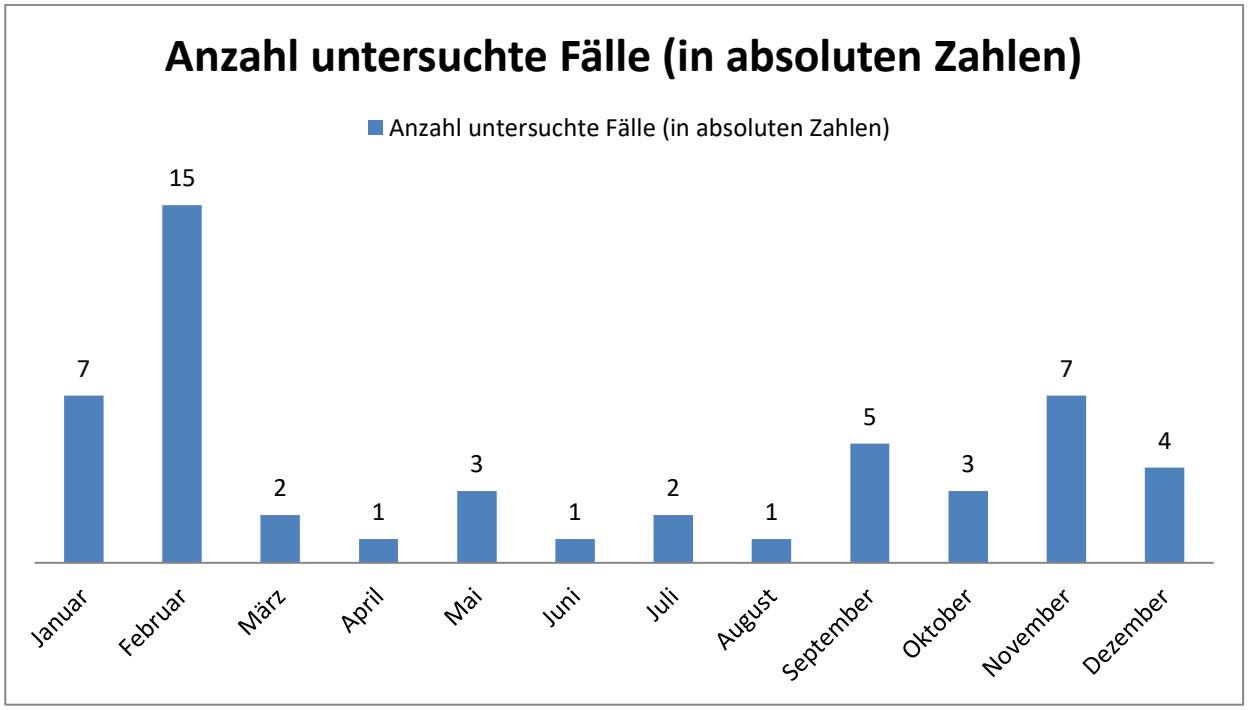

Abbildung 8 Todeszeitpunkt nach Monaten im Hypothermiekollektiv

16 der Verstorbenen (31,3 %) wurden im freien Gelände aufgefunden. Bei den Auffindeorten handelte es sich fünfmal um Waldwege, in einem Fall um einen Bach, in einem weiteren Fall um eine Garage, in drei Fällen um den Garten, einem Fall eine Böschung und in zwei Fällen um einen abgestellten Personenkraftwagen. Die übrigen drei Verstorbenen befanden sich unter freiem Himmel, darunter einmal auf einem Parkplatz und zweimal auf einer Bank.

Die anderen 35 Verstorbenen (68,6 %) wurden innerhalb eines Gebäudes entdeckt (Wohnung, Krankenhaus). Die rektale Temperatur und Umgebungstemperatur wurden nur in wenigen Fällen ermittelt, daher sind keine Aussagen hinsichtlich der Liegedauer bzw. Rückschlüsse auf die Dauer der Kälteexposition und eventueller Überlebenszeit nach Exposition möglich.

3.4 Aquaporin-Expression- Hypothermiekollektiv versus Kontrollkollektiv

3.4.1 Expression von AQP1

Von 48 untersuchten Herzen im Hypothermiekollektiv ließ sich in zehn Fällen (20,83 %) eine AQP1- Expression (s. Tabelle 7) nachweisen. Im Durchschnitt wurden 8,69 % der Fläche angefärbt, die Intensität der Färbung wurde im Mittel als positiv bewertet (s. Abb.

9). In den 45 Herzen der Kontrollkollektivs war in keinem Fall eine AQP1- Expression nachweisbar.(s. Tab. 7)

Neun der 43 (20,93 %) untersuchten Lebern im Hypothermiekollektiv wiesen eine verstärkte AQP1-Expression auf (s. Abb. 9). Die durchschnittlich angefärbte Fläche betrug 2,20 % (siehe Tab. 8), die Färbeintensität wurde als positiv eingestuft. In den Lebern des Kontrollkollektivs war keine AQP1- Expression nachweisbar.

In den 46 untersuchten Nieren des Hypothermiekollektivs fand sich in 22 Fällen (47,82 %) eine AQP1- Expression . Im Durchschnitt wurden 3,22 % der Fläche angefärbt (s. Abb.9), die Intensität wurde als positiv eingestuft. Demgegenüber konnte im Kontrollkollektiv in drei Fällen (6,25 %) eine AQP1- Expression nachgewiesen werden. Die durchschnittlich gefärbte Fläche betrug 2,46 %, (s. Abb. 9)) auch hier wurde die Intensität im Mittel als positiv bewertet.

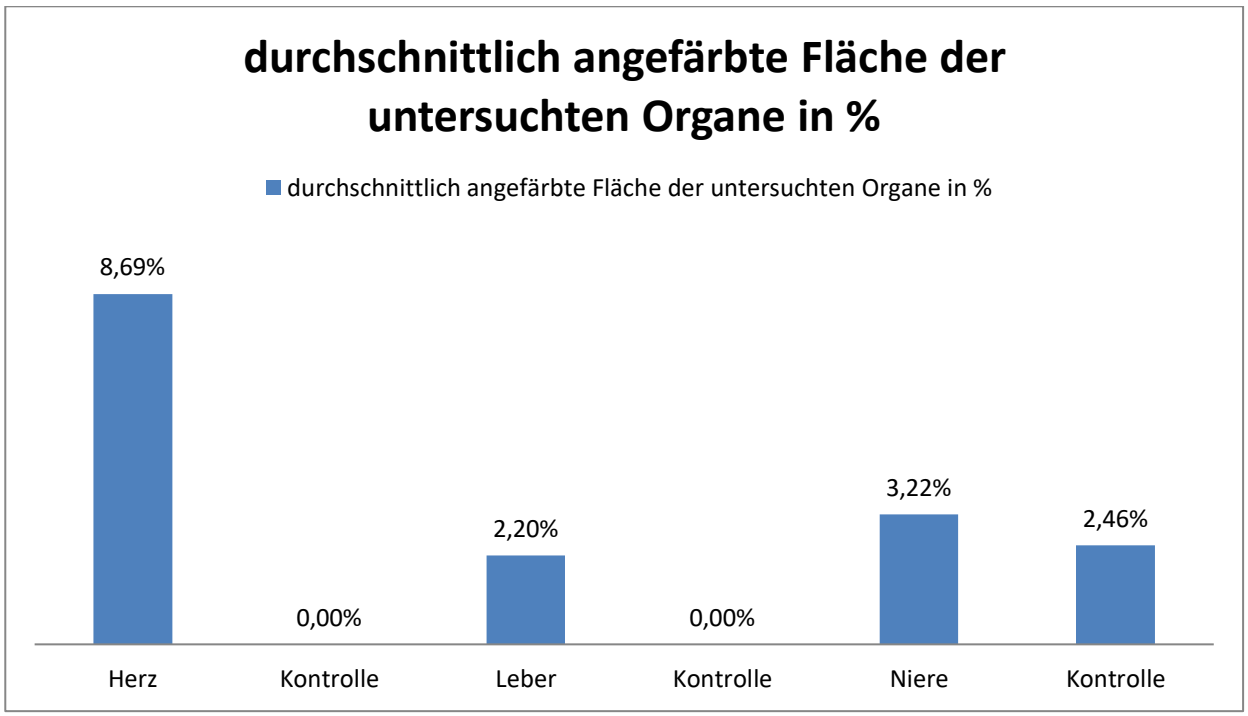

Abbildung 9 Anteil der Aquaporin 1 (AQP1) positiven Fläche des Herz-, Leber- und Nierengewebes im Hypothermie- und Kontrollkollektiv

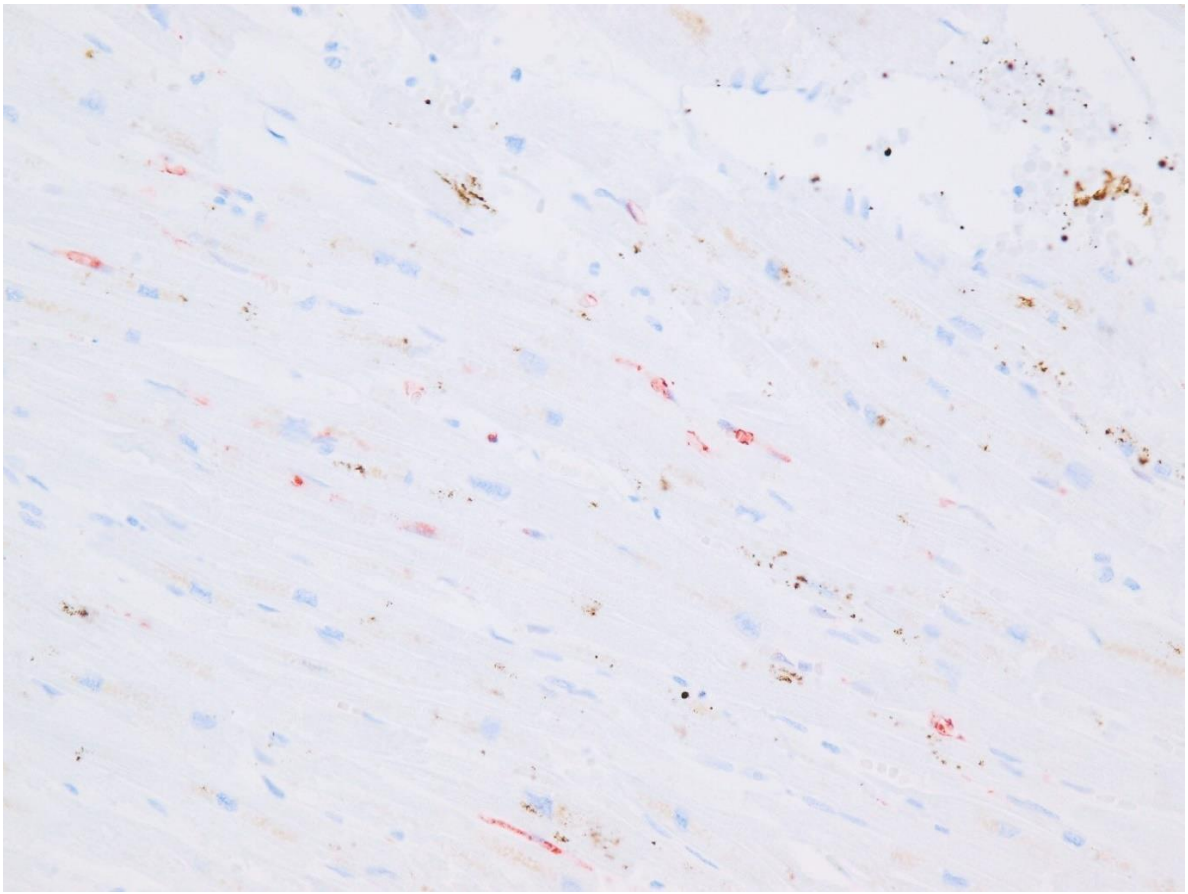

Abbildung 10 Immunhistochemischer Nachweis von Aquaporin 1 (AQP1) in Herzgewebe (Vergrößerung: 1:400)

AQP1-Expression: 3,68 % angefärbte Fläche, Intensität „positiv“

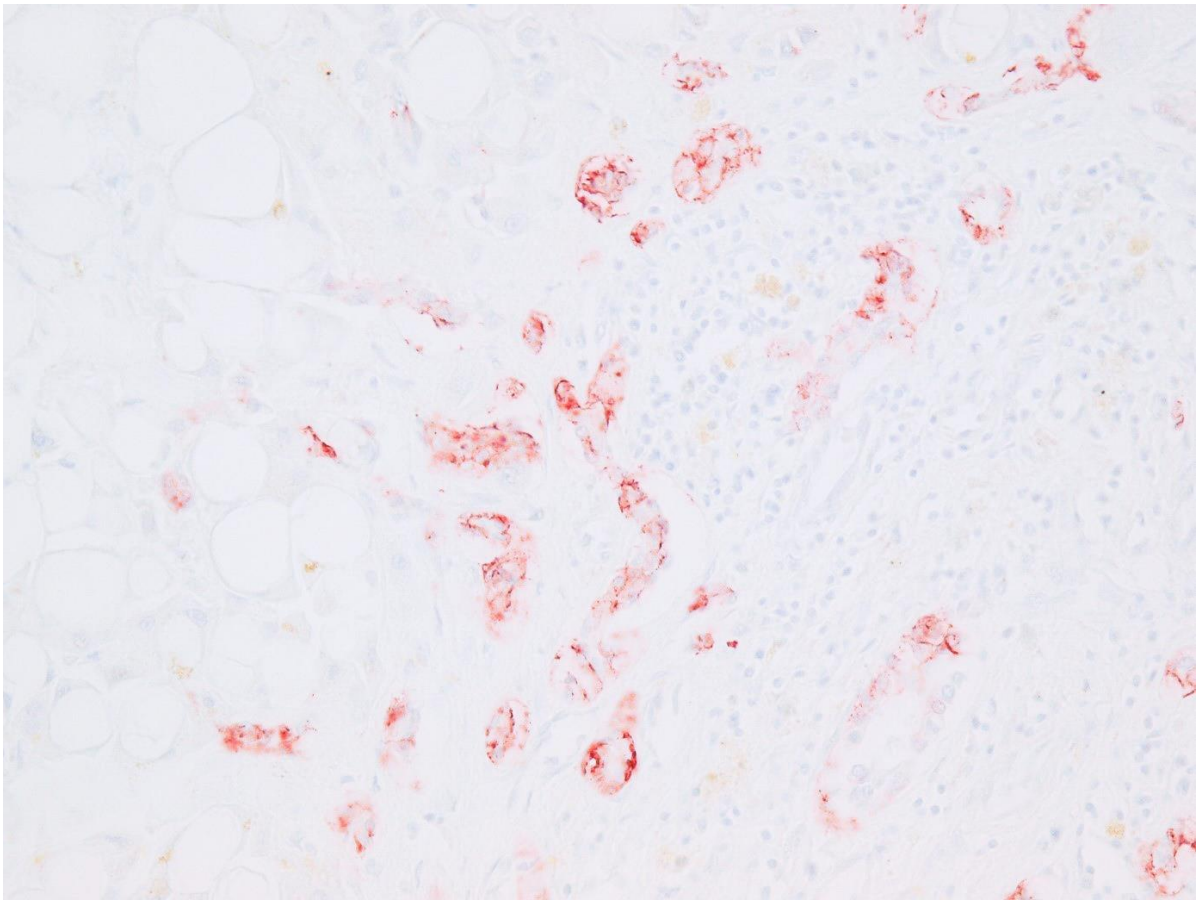

Abbildung 11 Immunhistochemischer Nachweis von Aquaporin 1 (AQP1) in Lebergewebe (Vergrößerung: 1:400)

AQP1-Expression: 10,93 % angefärbte Fläche, Intensität „positiv“

3.4.2 Expression von AQP 3

Im Hypothermiekollektiv war in einem der Herzen eine AQP 3- Expression nachweisbar (2,08 %) (s.Tab. 7). Der Anteil der durchschnittlich gefärbten Fläche betrug bei 0,41 %,(s. Abb. 12) die Intensität wurde als gering positiv eingestuft. In den Herzen des Kontrollkollektivs war keine AQP 3- Expression nachweisbar.

Bei den untersuchten Lebern fand sich in einem der Fälle eine AQP 3- Expression. (2,32%) (s. Abb. 12). Die angefärbte Fläche betrug durchschnittlich 5,13 %, (s. Tab. 8) die Graduierung der Intensität wurde als positiv bewertet. Auch hier ließ sich im Kontrollkollektiv keine Färbung und damit auch keine AQP 3- Expression feststellen.

40 der 46 untersuchten Nieren (86,95 %) des Hypothermiekollektivs wiesen eine AQP 3-Färbung auf (s. Abb. 12). Im Durchschnitt waren 8,6 % der Fläche angefärbt (s. Tab. 8);

die Intensität der Färbung war positiv (s. Abb. 12). Im Kontrollkollektiv zeigten 45 der untersuchten Nieren (93,75 %) eine Reaktion (s. Tab. 8). Hier betrug die durchschnittlich angefärbte Fläche 6,44 % bei einer als im Mittel bewerteten Farbintensität von positiv.

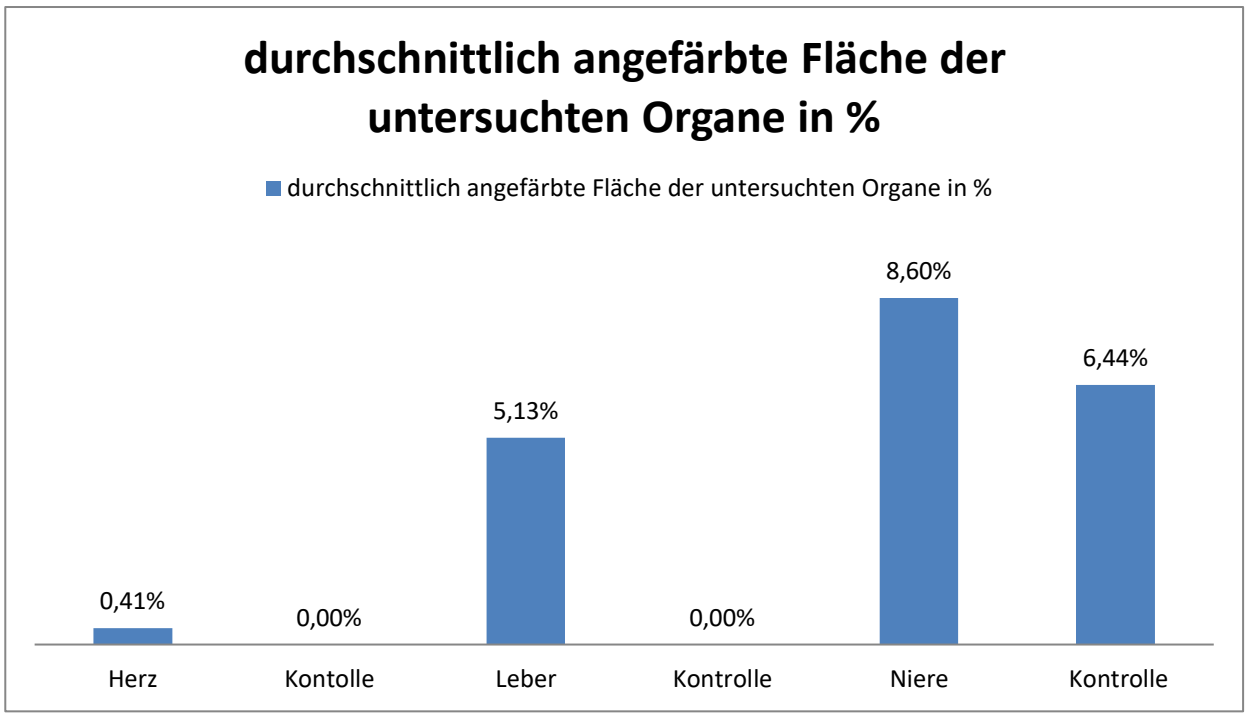

Abbildung 12 Anteil der Aquaporin 3 -(AQP3) positiven Fläche des Herz-, Leber- und Nierengewebes im Hypothermie- und Kontrollkollektiv

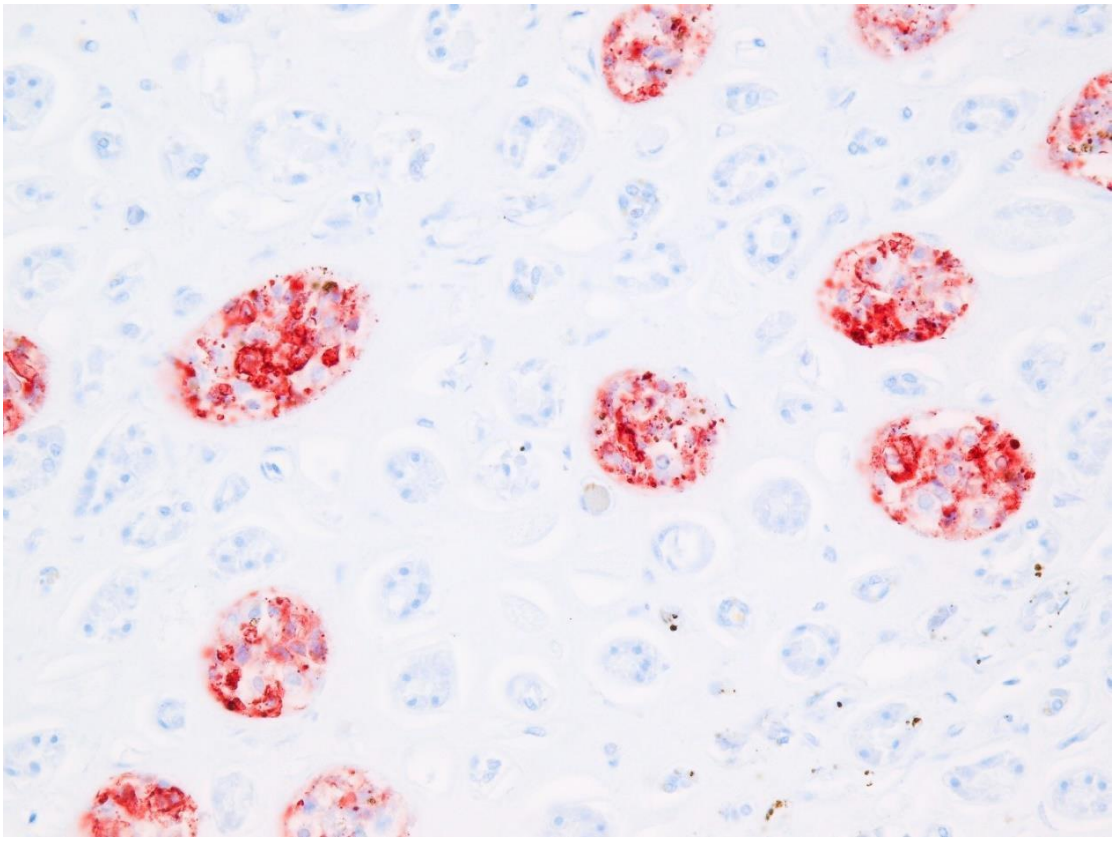

Abbildung 13 Immunhistochemischer Nachweis von Aquaporin 3 (AQP3) in Nierengewebe (Vergrößerung 1:400)

AQP3-Expression 12,85 % angefärbte Fläche, Intensität „hoch positiv“

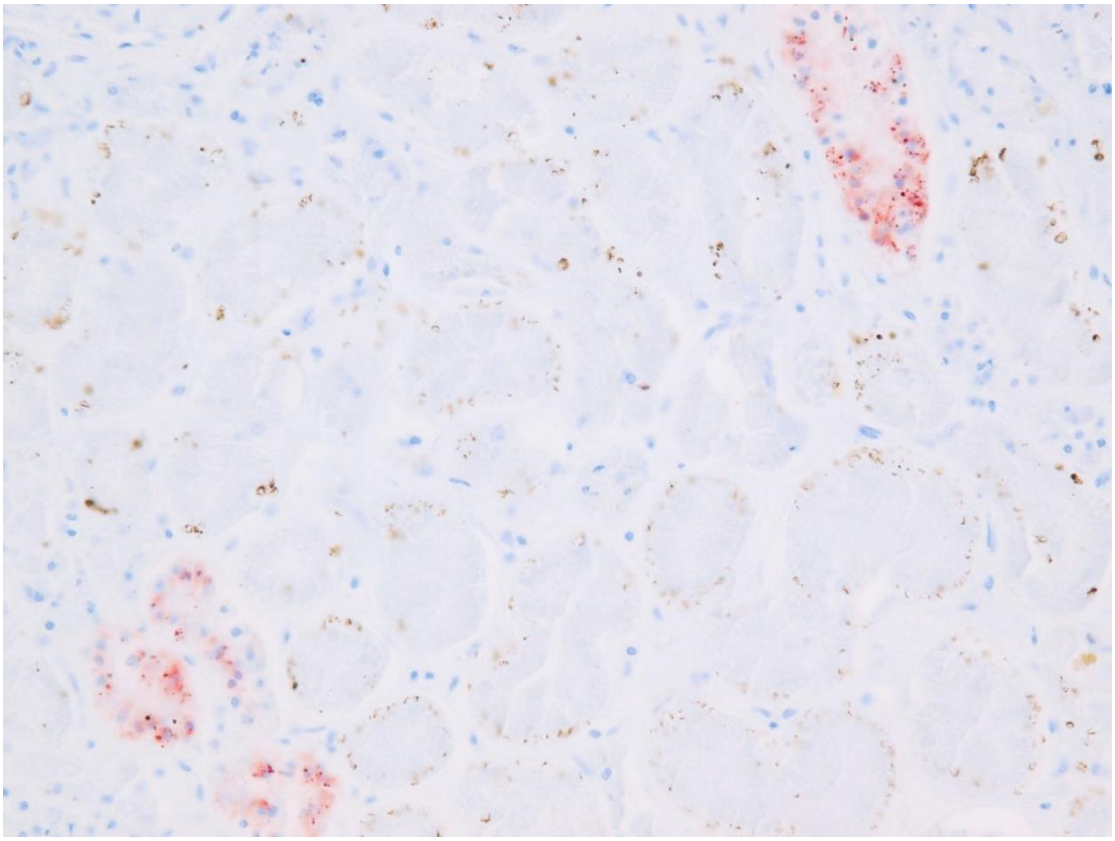

Abbildung 14 Immunhistochemischer Nachweis von Aquaporin 3 (AQP3) in Nierengewebe (Vergrößerung 1:400)

AQP3-Expression: 4,79 % angefärbte Fläche, Intensität „positiv“

3.5 Heat-shock-Protein (HSP)-Expression – Hypothermiekollektiv versus Kontrollkollektiv

3.5.1 Expression von HSP27

Sechs von 48 (12,50 %) der untersuchten Herzen des Hypothermiekollektivs wiesen eine HSP27-Expression auf. Der durchschnittliche Anteil der gefärbten Fläche betrug 2,30 %; die Intensität der Färbung wurde als positiv bewertet. Im Kontrollkollektiv konnte in zwei von 45 Fällen (4,44 %) eine Reaktion nachgewiesen werden. Hier lag der durchschnittliche Anteil der angefärbten Fläche bei 1,60 %, die Farbintensität wurde mit positiv bewertet (s. Abb. 15).

Bei den Lebern zeigten im Hypothermiekollektiv vier von 43 Fällen (9,30 %) eine positive Reaktion. Der mittlere Anteil der gefärbten Fläche betrug 2,80 %; die Farbintensität war

positiv. Im Kontrollkollektiv wurde keine HSP 27- Expression nachgewiesen (s.Tab. 8 und Abb. 15).

In zwölf von 46 Fällen (26,08 %) zeigten die Nieren des Hypothermiekollektivs eine HSP27- Expression. Durchschnittlich waren 4,13 % der Fläche angefärbt, die Färbeintensität wurde als positiv eingestuft. (s. Abb. 15) Auch im Kontrollkollektiv wies eine der 48 untersuchten Nieren (2,08 %) eine HSP27- Expression auf. Im Mittel betrug der Anteil der angefärbten Fläche 1,93 %; die Intensität wurde als positiv bewertet (s. Abb. 15).

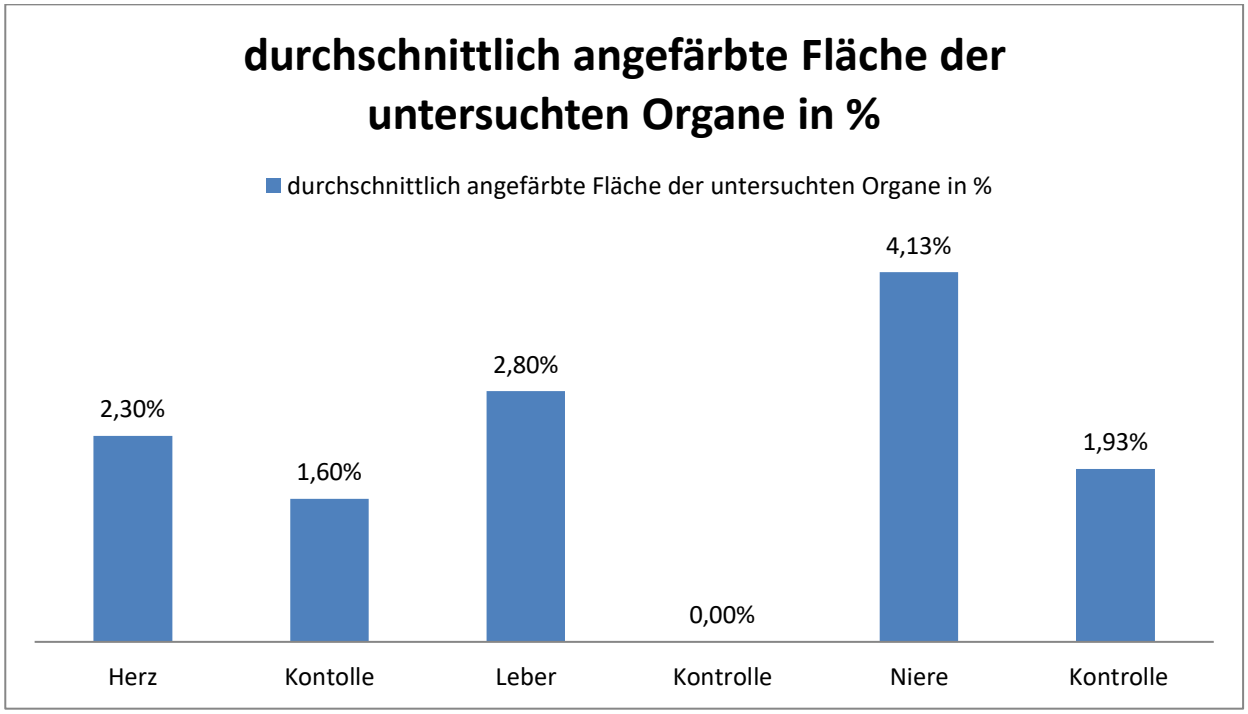

Abbildung 15 Anteil der Heat-shock-Protein 27 (HSP27-) positiven Fläche des Herz-, Leber- und Nierengewebes im Hypothermie- und Kontrollkollektiv

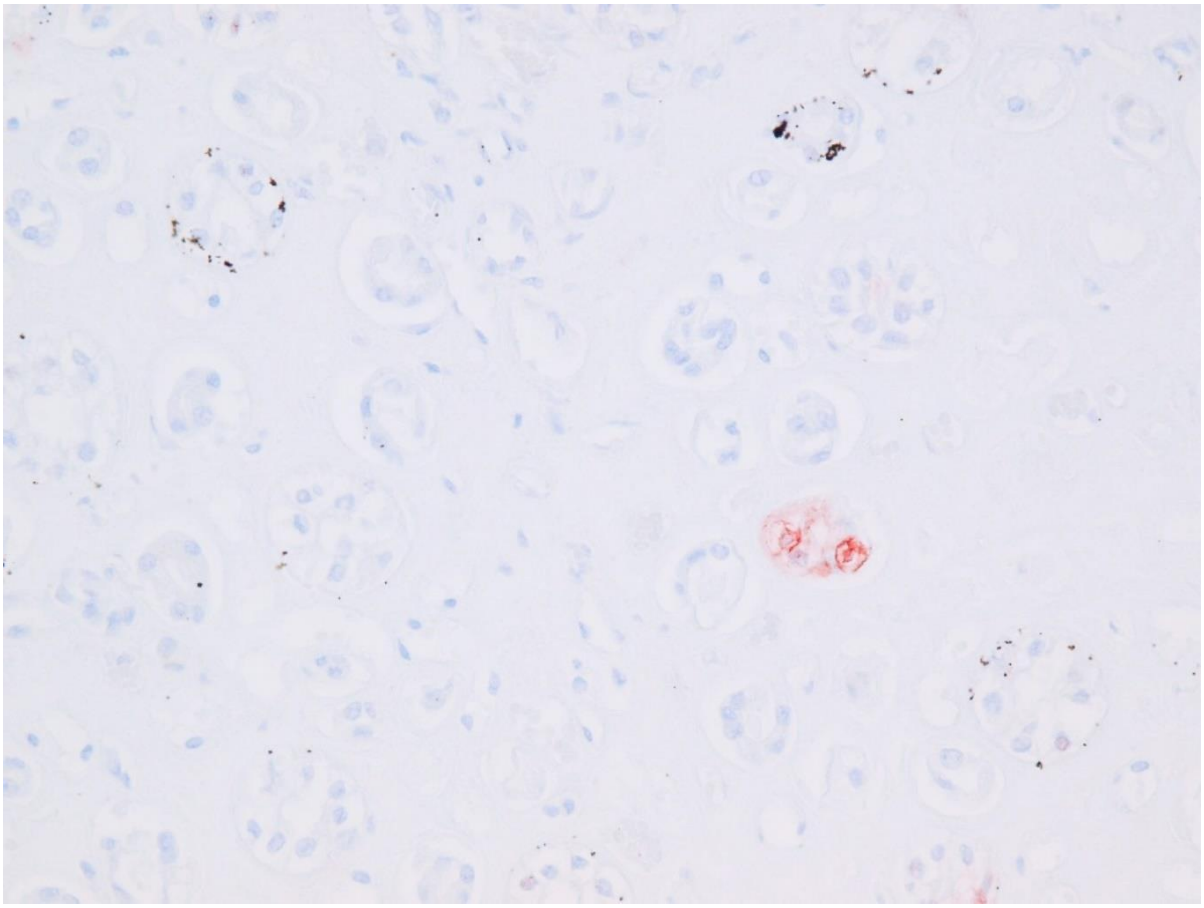

Abbildung 16 Immunhistochemischer Nachweis von Heat-shock-protein 27 (HSP27) in Nierengewebe (Vergrößerung 1:400)

HSP27-Expression: 2,08 % angefärbte Fläche, Intensität „positiv“

3.5.2 Expression von HSP60

Im Hypothermiekollektiv wurde in elf der 48 untersuchten Herzen (22,91 %) eine HSP60-Expression nachgewiesen (s. Tab. 7). Der durchschnittliche Anteil der gefärbten Fläche betrug 5,44%; die Intensität wurde im Mittel mit positiv bewertet. Im Kontrollkollektiv wurde keine HSP60-Expression nachgewiesen (s.Abb. 17).

Die Lebern des Hypothermiekollektivs zeigten in 16 der 43 Fällen (37,20%) eine HSP60-Expression (s. Tab. 7) Durchschnittlich färbten sich 8,95 % der Fläche an; die Färbeintensität wurde mit positiv beurteilt.(s. Abb. 17) Das Kontrollkollektiv zeigte in zwei von 43 Fällen (4,65 %) eine HSP60-Expression; der Anteil der gefärbten Fläche betrug 4,02 % und die Färbeintensität wurde als niedrig positiv eingestuft.(s. Abb. 17)

Bei den Nieren des Hypothermiekollektivs zeigte sich in 17 von 46 Fällen (36,95 %) eine HSP60- Expression (s. Tab. 7). Der durchschnittlich gefärbte Anteil der Fläche betrug 4,13 %, die mittlere Intensität der Färbung wurde mit positiv bewertet.(s. Abb. 17) Im Kontrollkollektiv war in 22 der 48 Nieren (45,83 %) eine HSP60- Expression nachweisbar (s. Tab. 7). Hier war durchschnittlich 3,24 % der Fläche angefärbt, die Färbeintensität wurde als positiv bewertet (s. Abb. 17).

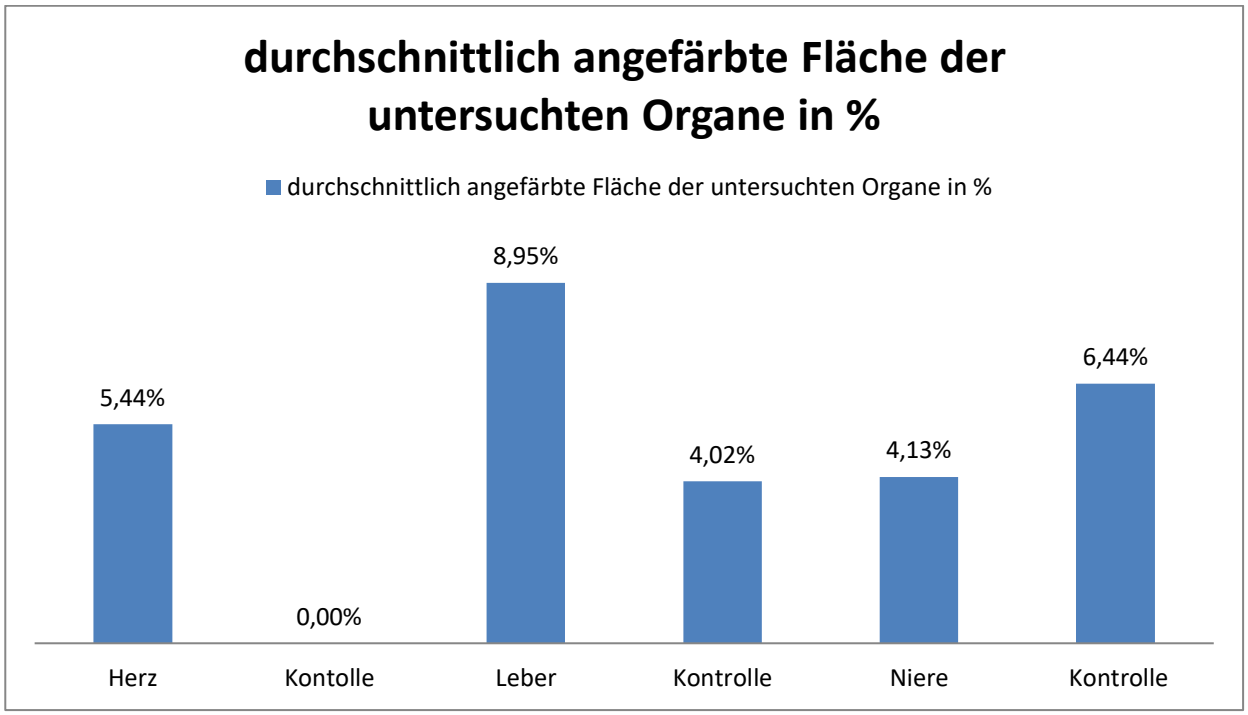

Abbildung 17 Anteil der Heat-shock-Protein 60 (HSP60) positiven Fläche des Herz-, Leber- und Nierengewebes im Hypothermie- und Kontrollkollektiv

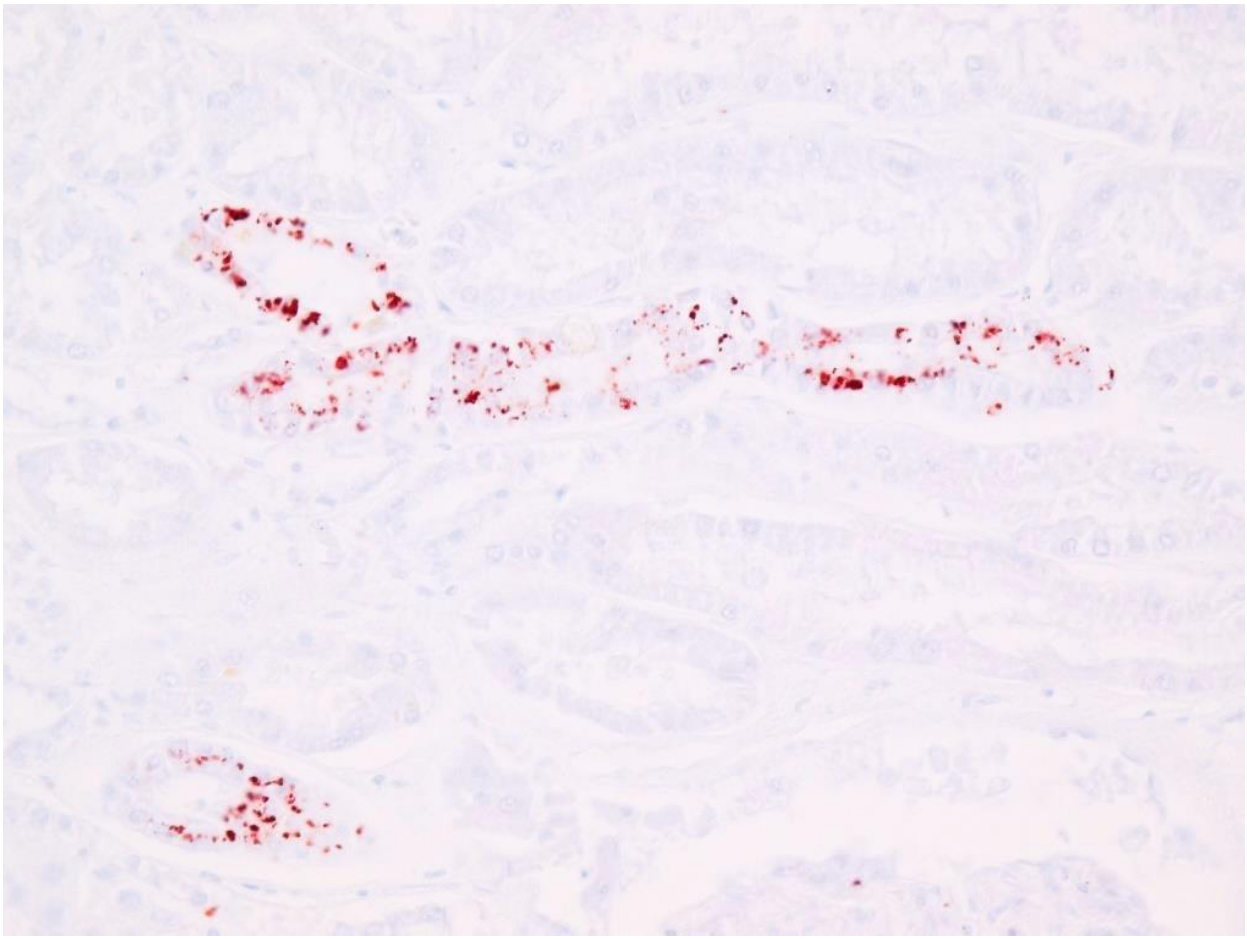

Abbildung 18 Immunhistochemischer Nachweis von Heat-shock-protein 60 (HSP60) in Nierengewebe (Vergrößerung 1:400)

HSP60-Expression: 4,27 % angefärbte Fläche, Intensität „positiv“

3.5.3 Expression von HSP70

In sechs von 48 untersuchten Herzen des Hypothermiekollektivs (12,50 %) war eine HSP70- Expression nachweisbar. (s. Tab. 7) Der mittlere Anteil der angefärbten Fläche betrug 3,73% bei einer als niedrig positiv eingestuften Färbeintensität. Im Kontrollkollektiv trat keine HSP70- Expression auf (s. Abb. 19).

Im Hypothermiekollektiv trat in vier der 43 untersuchten Lebern (9,30 %) eine HSP70-Expression auf. (s. Tab. 7) Im Durchschnitt färbte sich 4,26 % der Fläche an, die Intensität wurde als positiv eingestuft. Für das Kontrollkollektiv trat keine HSP70-Expression auf (s. Abb. 19).

Elf der 46 untersuchten Nieren des Hypothermiekollektivs (23,91 %) wiesen eine HSP70-Expression auf. (s. Tab. 7) Hier lag der mittlere Anteil der angefärbten Fläche bei 5,11 %

bei einer als positiv bewerteten Färbeintensität. (s. Abb. 19) Lediglich ein Fall des Kontrollkollektivs exprimierte HSP70 (2,08 %). Der durchschnittliche Anteil der angefärbten Fläche betrug 2,88 %; die Färbeintensität wurde als positiv eingestuft (s. Abb. 19).

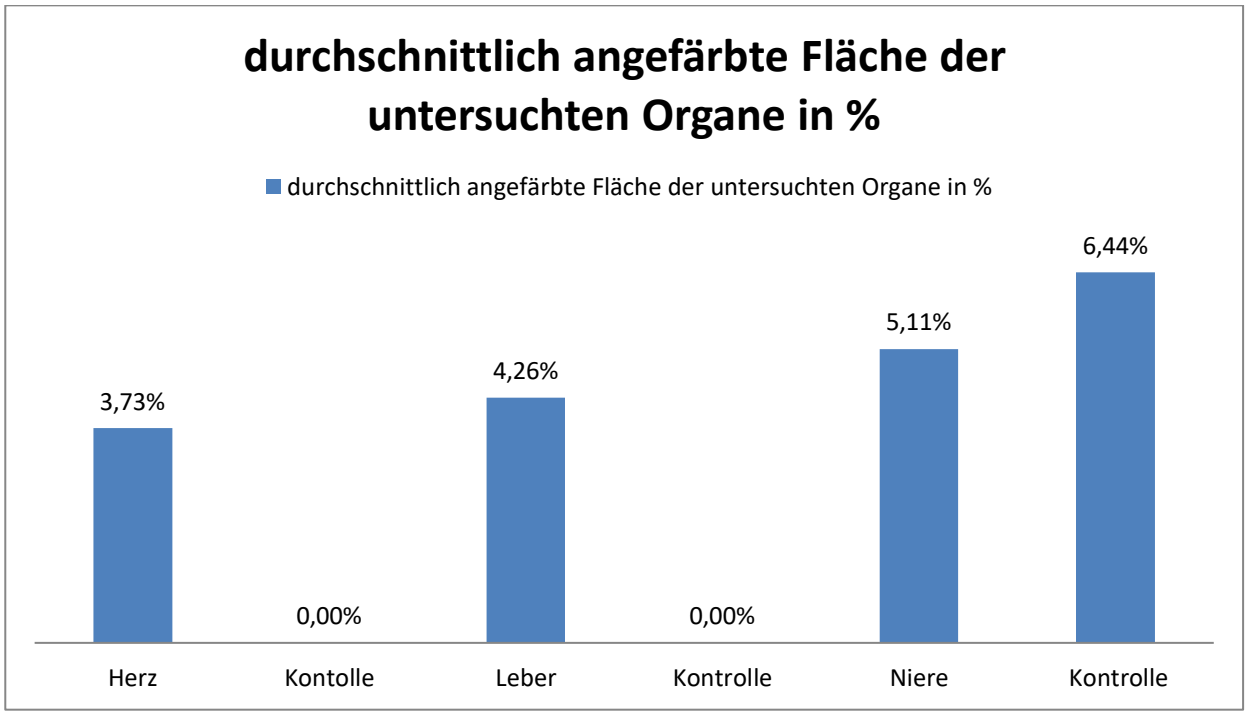

Abbildung 19 Anteil der Heat-shock-Protein 70 (HSP70) positiven Fläche des Herz-, Leber- und Nierengewebes im Hypothermie- und Kontrollkollektiv

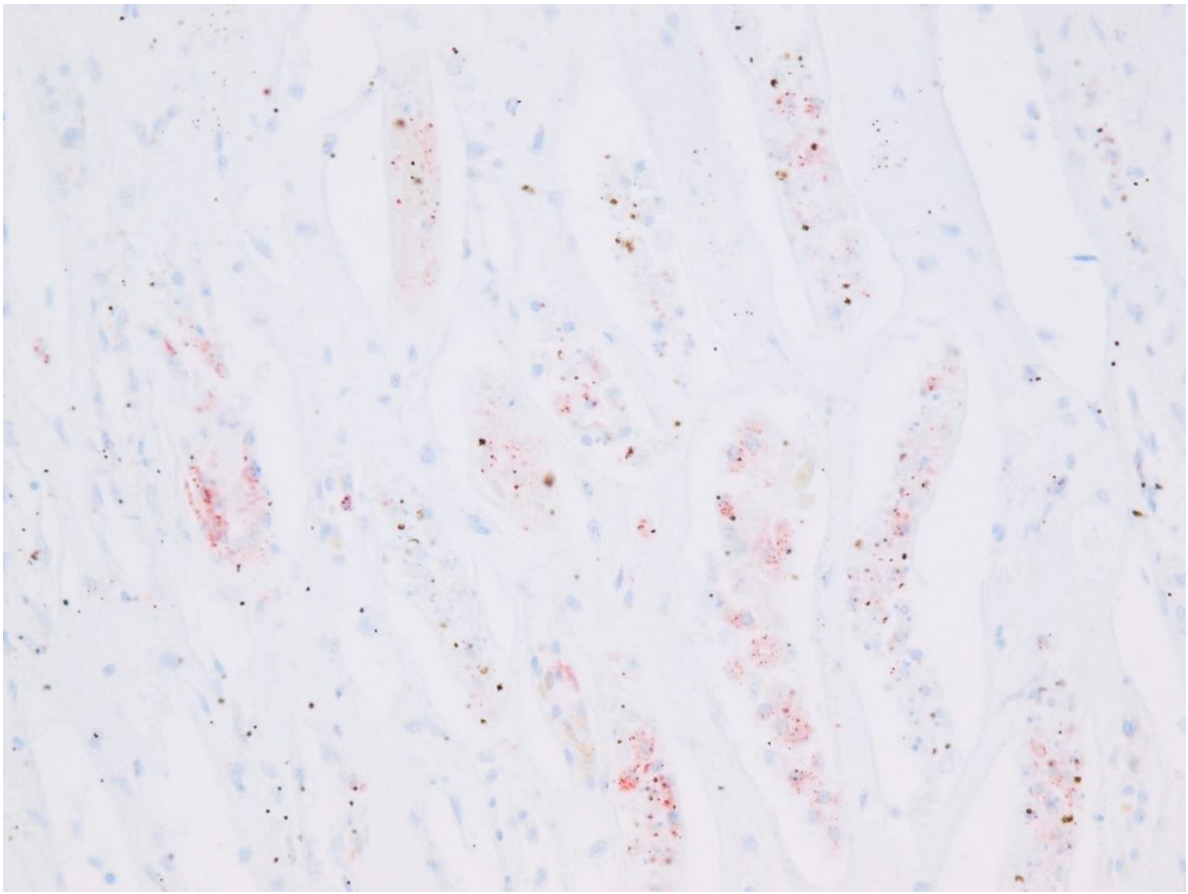

Abbildung 20 Immunhistochemischer Nachweis von Heat-shock-protein 70 (HSP70) in Nierengewebe (Vergrößerung 1:400)

HSP70- Expression: 12,43 % angefärbte Fläche, Intensität „niedrig positiv“

3.6 AQP- und HSP-Expression – Vergleich Hypothermie- vs. Kontrollkollektiv

Tabelle 8 fasst noch einmal den Anteil positiver Proben in der Hypothermie- und Kontrollgruppe für die untersuchten AQPs und HSPs zusammen. In den Herzproben wurde im Kontrollkollektiv in zwei Fällen eine HSP27- Expression nachgewiesen, in den Leberproben des Kontrollkollektivs in zwei Fällen eine HSP60- Expression. In den Nierenproben des Kontrollkollektivs wurden alle untersuchten Proteine exprimiert.

Tabelle 7 Aquaporin (AQP)- und Heat-shock-Protein (HSP)- Expression in Herz-, Leber- und Nierengewebe – Anteil positiver Proben

Herz					
Gruppe	**AQP1**	**AQP3**	**HSP27**	**HSP60**	**HSP70**
Hypothermie (n=48)	20,83 % (10/48)	2,08 % (1/48)	12,50 % (6/48)	22.91 % (11/48)	12,50 % (6/48)
Kontrolle (n=45)	**–**	**–**	4,44 % (2/45)	**–**	**–**
Leber					
Hypothermie (n=43)	20,93 % (9/43)	2,32 % (1/43)	9,30 % (4/43)	37,20 % (16/43)	9,30 % (4/43)
Kontrolle (n=43)	**–**	**–**	**–**	4,65 % (2/43)	**–**
Niere					
Hypothermie (n=46)	47,82 % (22/46)	86,95 % (40/46)	26,08 % (12/46)	36,95 % (17/46)	23,91 % (11/46)
Kontrolle (n=48)	6,25 % (3/48)	93,75 % (45/48)	2,08 % (1/48)	45,83 % (22/48)	2,08 % (1/48)

Der Vergleich zwischen der AQP- und HSP- Expression zwischen dem Hypothermie- und Kontrollkollektiv erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test (s. Tab. 9).

Tabelle 8 Aquaporin (AQP)- und Heat-shock-Protein (HSP)- Expression in Herz-, Leber- und Nierengewebe – Anteil der immunhistochemisch positiven Flächen und Färbeintensität

Herz					
Gruppe	**AQP1**	**AQP3**	**HSP27**	**HSP60**	**HSP70**
Hypothermie (n=48)	8,69 % Positive	0,41 % niedrig positiv	2,30 % positive	5,44 % positiv	3,73 % niedrig positiv
Kontrolle (n=45)	**–**	**–**	1,60 % positive	**–**	**–**
p-Wert	**<0,001**	0,328	0,144	**<0,001**	**<0,0012**

Leber					
Hypothermie (n=43)	2,20 % Positive	5,13 % positiv	2,80 % positive	8,95 % positiv	4,26 % Positive
Kontrolle (n=43)	**–**	**–**	**–**	4,02 % positiv	**–**
p-Wert	**0,002**	0,329	**0,043**	**0,001**	**0,043**
Niere					
Hypothermie (n=46)	3,22 % Positive	8,60 % positiv	4,13 % positive	4,13 % positiv	5,11 % Positive
Kontrolle (n=48)	2,46 % Positive	6,44 % positiv	1,93 % positive	3,24 % positiv	2,88 % Positive
p-Wert	**<0,001**	0,174	**<0,001**	0,694	**0,002**

p-Werte, die einen signifikanten Unterschied aufweisen, sind fett gedruckt

AQP1 und HSP70 zeigten in allen untersuchten Organen eine signifikant unterschiedliche Expression im Hypothermie- und Kontrollkollektiv. Bei AQP3 war in keinem Organ ein signifikanter Unterschied detektierbar. Beim HSP27 waren die Expressionsraten in der Leber und in der Niere signifikant verschieden, bei HSP60 im Herz und in der Leber.

3.7 Korrelation zwischen BMI und Proteinexpression

In dieser Dissertation wurde ebenfalls untersucht, ob es eine Korrelation zwischen Proteinexpression und dem BMI der Verstorbenen des Hypothermiekollektivs gibt. Überprüft werden sollte, ob im positiven Fall das Auftreten eines Merkmals (der BMI) zur Vorhersage des anderen (die Proteinexpression) herangezogen werden kann. Aufgrund der teilweise geringen Anzahl an Stichproben wurde auf eine organspezifische Differenzierung verzichtet und alle positiven Ergebnisse in die Berechnung mit einbezogen. Für die Korrelationsanalyse wurde der Korrelationskoeffizient r berechnet.

Tabelle 9 Korrelation zwischen exprimierten Proteinen und BMI der Verstorbenen des Hypothermiekollektivs

Protein	Korrelationskoeffizient r
AQP1	-0,193
AQP3	**0,216**
HSP27	**-0,306**
HSP60	-0,154
HSP70	-0,183

r-Werte, die mindestens einen schwachen linearen Zusammenhang aufweisen, sind fett gedruckt

Bei AQP3 konnte eine schwache positive Korrelation gezeigt werden; bei HSP27 gab es einen schwachen negativen Zusammenhang. Im Fall der Proteine AQP1, HSP60 und HSP70 konnte keine Korrelation zwischen BMI und Expressionsrate gezeigt werden. Damit lässt sich festhalten, dass sich der BMI nicht zur zuverlässigen Vorhersage einer hohen oder niedrigen Proteinexpressionsrate eignet.

3.8 Vorerkrankungen im Hypothermie- und Kontrollkollektiv

Bei den Obduktionen wurden außerdem weitere makro- und mikroskopische Befunde als Anzeichen für akute oder chronische Vorerkrankungen festgestellt. Diese können die Expression von AQPs und HSPs sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. In der vorliegenden Untersuchung wurde in 23 Fällen (45,09 %) des Hypothermiekollektivs und in 28 Fällen (59,57 %) des Kontrollkollektivs eine Atherosklerose dokumentiert. Elf Fälle (22,91 %) des Hypothermiekollektivs zeigten ein kritisches Herzgewicht über 500g sowie acht Fälle des Kontrollkollektivs (16,66 %). In neun Fällen (18,75 %) wurden im Hypothermiekollektiv frische oder zurückliegende Myokardinfarkte detektiert, im Kontrollkollektiv war dies bei 15 Fällen (31,25 %) so. Sieben der obduzierten Leichen des Hypothermiekollektivs (13,72 %) und zwölf (25,00 %) Leichen des Kontrollkollektivs waren mit einem BMI >30 kg/m2 adipös. Im Hypothermiekollektiv zeigten zwölf Fälle (27,90 %) Anzeichen einer Leberverfettung und in sieben weiteren Fällen (16,27 %) eine Leberzirrhose. Bei zwölf (27,90 %) der obduzierten Leichen war ein chronischer Alkoholabusus vorhanden. In einem Fall hatte eine akute Alkoholintoxikation begleitend zum Tod durch Hypothermie beigetragen. Dieses Ergebnis passt zu der Tatsache, dass

an Hypothermie Verstorbene häufig zum Todeszeitpunkt alkoholisiert sind (Madea, 2003). Im Kontrollkollektiv wiesen 13 Lebern (27,08 %) Anzeichen einer chronischen Stauung auf und neun (18,75 %) eine Steatosis hepatis.

Tabelle 10 Vorerkrankungen der Verstorbenen des Hypothermie- und Kontrollkollektivs

Vorerkrankung	Fälle Hypothermiekollektiv	Fälle Kontrollkollektiv
Atherosklerose	23	28
Herzgewicht > 500 g	11	8
Frischer oder zurückliegender Myokardinfarkt	9	15
BMI > 30kg/m^2	7	12
Leberverfettung	12	9
Leberzirrhose	7	13

4. Diskussion

In der forensischen Diagnostik spielt die Ermittlung der Todesursache eine zentrale Rolle. Im Falle des Todes durch Hypothermie ist eine Absicherung häufig nur durch die Kombination von Auffindesituation, erhobenen Befunden bei der Obduktion und Vorgeschichte möglich. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war daher die Identifikation von spezifischen immunhistochemischen Markern (AQP1, AQP3, HSP27, HSP60, HSP70) für die Kälteeinwirkung auf den menschlichen Organismus. Verglichen wurde zudem, ob bei der Obduktion erhobene Befunde (Wischnewski-Flecken und Kälteerytheme) mit der Expression dieser Proteine korrelieren und ob der BMI die Expression beeinflusst.

4.1 Limitationen der Studie

Die AQP- und HSP- Expression wird durch zahlreiche Faktoren und nicht ausschließlich durch die Todesursache beeinflusst. Dadurch können die potenziellen Effekte der Hypothermie auf die Expression überdeckt werden. Zu den Vorerkrankungen, die die Expression verringern können, gehören Gendefekte oder Genpolymorphismen. (Rahim, Boyd et. al, 1996) In solchen Fällen wäre auch bei einer Hypothermie keine Expression zu erwarten (falsch negative Befunde in der Immunhistochemie).

Weiter existieren chronische und akute Vorerkrankungen (z. B. Hypertonie, Diabetes mellitus, chronische Erkrankungen der Nieren), die die AQP- und HSP- Expressionsraten erhöhen. (Fernandez-Llama et. al, 2000, Hoogewijs, Vogler, 2016) In solchen Fällen wäre auch ohne Hypothermie eine erhöhte Expression zu erwarten (falsch positive Befunde in der Immunhistochemie).

Es existieren Studien, dass die Fixierung des Gewebes in Formalin über längere Zeit einen negativen Einfluss auf die Anfärbbarkeit der Proteine hat. Durch die Formalinfixierung kommt es unter anderem zu Protein-Protein-Querverbindungen, welche die Diffusion der Antikörper in das Gewebe erschwert. Zudem kann sich die Struktur der Epitope verändern und dadurch verringert sich ebenfalls die Antikörperbindung. (Preusse-Prange et al., 2014)

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass die Vollständigkeit der Anamnese in Bezug auf die Vorerkrankungen nicht garantiert werden kann. Obwohl

Wohnsitzlose häufig an Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (7-20 %), an Erkrankungen der Atmungsorgane (6-14 %) und an behandlungsbedürftigen psychiatrischen Störungen (75 %) leiden, nehmen sie das medizinische Versorgungssystem aufgrund vielfältiger Barrieren seltener in Anspruch. (Kaduszkiewicz et al., 2017) Daher ist anzunehmen, dass die Krankheitsvorgeschichte und eine daraus resultierende mögliche Beeinflussung der AQP- und HSP-Expression nicht immer lückenlos nachvollziehbar waren.
Weiterhin erwies sich die immunhistochemische Untersuchung als technisch herausfordernd. Die Fragilität der Gewebe beim Zuschneiden am Mikrotom stellte vor allem bei den untersuchten Lebern einen limitierenden Faktor dar. In einigen Fällen konnte das Gewebe trotz großer Sorgfalt beim Zuschneiden nicht erhalten werden. Dadurch verringerte sich der Anteil der untersuchten Organe im Hypothermie- und Kontrollkollektiv.
Zudem muss gesagt werden, dass kein Protein für alle Verstorbenen des Hypothermiekollektivs das gleiche Ergebnis anzeigte. Die Expressionsraten unterschieden sich teilweise erheblich.

4.2 Aquaporine

Die Ergebnisse belegen, dass weder AQP1 noch AQP3 als spezifische Marker für eine Hypothermieeinwirkung verwendet werden können. Im Hypothermiekollektiv war in Herz- und Lebergewebe in einigen Fällen eine AQP-Expression nachweisbar, während die Gewebe der Kontrollgruppe durchgängig negativ waren. Der Anteil der AQP1- bzw. AQP3- positiven Flächen war jedoch auch im Hypothermiekollektiv mit 20 % (AQP1) bzw. 2 % (AQP3) relativ gering. Ob die Expression ausschließlich auf die Hypothermie zurückzuführen war, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Eine fehlende AQP-Expression kann demnach nicht als Ausschlusskriterium für einen Tod durch Hypothermie verwendet werden. Auch bei gesicherter Anamnese und eindeutigen makroskopischen Befunden waren die immunhistochemischen Ergebnisse überwiegend negativ.

In den Nieren war die AQP1-Expression im Hypothermiekollektiv (47,82 %) höher als im Kontrollkollektiv (6,25 %), auch die Anteile der gefärbten Flächen unterschieden sich signifikant voneinander. Der Anteil der positiven AQP3-Befunde im Kontrollkollektiv (93,75

%) war deutlich höher als im Hypothermiekollektiv (86,95 %), der Anteil der AQP3-positiven Flächen unterschied sich aber nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. AQP3 wird auch unter physiologischen Bedingungen in der Niere synthetisiert. Die AQP3-Expression in diesem Organ kann durch verschiedene Faktoren gesteigert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation belegen, dass es in einigen Fällen bei einer Hypothermie zu einer AQP1- und AQP3- Expression im Herz- und Lebergewebe kam. Ein Einfluss anderer Faktoren auf die Expression kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Weiter zeigte der überwiegende Anteil der an einer Hypothermie Verstorbenen keine AQP-Expression in diesen Geweben, so dass negative immunhistochemische Befunde eine Hypothermie als Todesursache nicht ausschließen können.

4.2.1 Expression von AQP bei renalen Vorerkrankungen

Tabelle 11 AQPs- Lokalisation, Funktion und assoziierte Erkrankungen

AQP-Isoform	Lokalisation	Funktion	Erkrankungen
AQP1	Apikale und basolaterale Membran proximaler Tubuli, absteigender Schenkel der Henle-Schleife, Vasa recta	Wasserrückresorption	ADPKD, Polyhydramnion
AQP2	Hauptzellen der Sammelkanäle	Vasopressinabhängige Wasserrückresorption, langfristige Regulation des Wasserhaushalts	Hereditärer nephrogener Diabetes insipidus (NDI), Lithium-induzierter Diabetes insipidus (LNDI), Elektrolytstörungen, akutes und chronisches Nierenversagen, Harnleiterobstruktion, nephrotisches Syndrom, kongestive Herzinsuffizienz, Leberzirrhose, SIADH
AQP3	Basolaterale Membran der Hauptzellen der Sammelkanäle	Kanäle für das durch Vasopressin rückresorbierte Wasser aus dem Urin, Regulation des Durstgefühls, Glycerintransport,	Nephrotisches Syndrom, akues Nierenversagen

		H_2O_2-Transport	
AQP4	Basolaterale Membran der Hauptzellen der Sammelkanäle	Kanäle für das durch Vasopressin rückresorbierte Wasser aus dem Urin	Polyurie, verminderte Harnkonzentrationsfähigkeit
AQP6	In Vesikeln gespeichert, Hauptzellen der Sammelkanäle	Evtl. Chlorid-Kanal, Harnsäuresekretion	
AQP7	Bürstensaum der proximalen Tubuli	Wasserrückresorption in den proximalen Tubuli, Glycerinresorption	Insulinresistenz, Glycerinurie, metabolisches Syndrom
AQP8	Proximale Tubuli, Hauptzellen der Sammelkanäle	Evtl. Ammoniaktransport	
AQP11	ER proximaler Tubuluszellen	Glukoseabhängige Wasserrückresorption	Chronisches Nierenversagen bei Typ-II-Diabetes

(Agawal und Gupta, 2008, Brown, 2017, Kwon et al., 2013, Nielsen et al., 2002, Su et al., 2020)

Bei der autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) kommt es zu einer zystischen Umwandlung des Nierenmarks und der Nierenrinde und konsekutiv zu einer chronischen Niereninsuffizienz. Laut einer Studie verlangsamt eine AQP1-Überexpression bei ADPKD das Wachstum der Nierenzysten. Ein AQP1-Mangel führt über eine Akkumulation von ß-Catenin dagegen zur Aktivierung des Wnt-Signalweges. Damit hemmt AQP1 den Wnt-Signalweg und verzögert so die Progression des Zystenwachstums. (Wang et al., 2019a) Eine AQP3-Überexpression wird dagegen mit einer Zunahme der Zysten bei ADPKD in Verbindung gebracht. Zudem scheint der Energieverbrauch durch aerobe Glykolyse innerhalb der Zellen erhöht zu sein. Diese

Befunde weisen auf weitere, über den Transport von Wasser oder Glycerol hinausgehende Funktionen von AQP3 hin. (Wang et al., 2019a)

Das Nierenzellkarzinom (RCC) ist die häufigste Neoplasie der Niere bei Erwachsenen und macht ca. 3 % aller malignen Tumore aus. Laut verschiedener Studien kann das AQP1-Vorkommen im Urin als Hinweis auf ein vorliegendes Nierenzellkarzinom interpretiert werden. Somit eignet sich das Protein auch zum Screening asymptomatischer Patienten. (Morrissey et al., 2015, Sreedharan et al., 2014)

Tierexperimentelle Studien lassen vermuten, dass die AQP-Expression mit akuten Nierenverletzungen und chronischen Nierenerkrankungen (z. B. diabetische Nephropathie, Nierenzellkarzinom) zusammenhängt. In Mäusen mit defektem AQP1-Gen ist die Niere nicht in der Lage, Harn zu konzentrieren (Polyurie), was auf eine Rolle des AQP1 bei der Entstehung der Hypertonie hinweist. (He und Yang, 2019)

Auch das häufig auftretende akute Nierenversagen (AKI), welches durch eine schnell abnehmende glomeruläre Filtrationsrate gekennzeichnet ist, steht mit der Expression von AQPs in engem Zusammenhang. Die häufigsten Ursachen sind prärenal (z. B. Ischämie durch Traumata, Hypovolämie, Sepsis). Beim akuten Nierenversagen ist die AQP1, AQP2- und AQP3-Expression vermindert; AQP1-Knockout-Mäuse zeigen schwerere Verläufe (He und Yang, 2019). Bei einem AQP3-Mangel nach renaler Ischämie wurde in Mäusen zudem eine erhöhte p53-Expression und damit eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen, was für die zellprotektive Wirkung von AQP3 spricht. (Lei et al., 2017)

Die angeborene Hydronephrose ist häufig eine Folge von Stenosen im Bereich der Ureteren oder der Urethra. Bereits im fetalen Stadium der Entwicklung beginnt die Niere mit der Regulation der Harnkonzentration. Störungen der AQP-Expression haben ein Oligo- oder Polyhydramnion zur Folge. Ab der 15. Schwangerschaftswoche steigen die AQP1-, AQP2- und AQP3-Expressionsraten an. Hydronephrotische fetale Nieren zeigen eine signifikant geringere Expression der drei AQPs und konsekutiv eine beeinträchtigte Harnkonzentrationsfähigkeit. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass es auch bei Erwachsenen mit Hydronephrose (z. B. aufgrund eines Nierensteins, einer Tumorerkrankung oder einer retroperitonealen Fibrose) zu einer erniedrigten AQP-Expression in der Niere kommt. Die Ursachen für die verminderte Expression sind noch nicht hinreichend bekannt. (Feng et al., 2019)

Bei einer Nierenfibrose führt ein bindegewebiger Umbau des Organs zu einer Niereninsuffizienz. Die Nierenfibrose ist die Folge verschiedener Grunderkrankungen (z. B. Diabetes mellitus) oder tritt nach mehrjähriger Dialyse sowie bei Autoimmunerkrankungen auf. Dabei kommt es zu einer Infiltration von Immunzellen und Aktivierung von Fibroblasten. Studien an Mäusen belegen eine Beteiligung von AQP1 an diesen Prozessen. Eine verminderte AQP1-Expression ist mit einer erhöhten Umbaurate des Nierengewebes assoziiert. Dadurch ergeben sich Ansatzpunkte für medikamentöse Therapien zur Unterbrechung des fibrotischen Umbaus. (Su et al., 2020, Wang et al., 2019a)

Die AQP-Expression in der Niere ist mit dem Vasopression-Spiegel assoziiert. In Brattleboro-Ratten führt ein verminderter Vasopression-Spiegel zu einer verminderten AQP2- und AQP3-Expression in der Niere. Eine eingeschränkte Vasopressin-Synthese hat entweder zentrale (z. B. Hypophysentumoren) oder nephrogene (z. B. Niereninsuffizienz) Ursachen. Die konsekutive Unfähigkeit der Niere, Harn zu konzentrieren, führt zu einer Polyurie und Polydipsie. Somit hängt die AQP-Expression teilweise auch von übergeordneten Zentren ab und kann nicht immer an äußere Umstände angepasst werden. (van Os und Deen, 1998).

Laut Fernandez-Llama et al. (2000) kommt es bei Ratten mit Leberzirrhose zu einem Anstieg der AQP1- und AQP3- Expression in der Niere und zu Veränderungen der Expression weiterer Transportproteine im Tubulussystem, woraus eine mangelnde Harnkonzentrationsfähigkeit der Niere resultiert. Diese Befunde belegen die wechselseitige Einflussnahme verschiedener Organsysteme.

Auch die Hypoxie scheint eine Rolle bei der Induktion der AQP-Synthese zu spielen. In renalen murinen Tumorzellen, die gezielt einer Hypoxie ausgesetzt wurden, war die AQP3-Expression erhöht. Diese Befunde belegen, dass nicht nur thermische Reize die AQP-Expression beeinflussen. Eine veränderte AQP-Expression ist eher als Antwort auf zellulären Stress zu verstehen. (Hoogewijs und Vogler, 2016)

4.2.2 Expression von Aquaporinen bei hepatischen Vorerkrankungen

Derzeit existieren nur wenige Studien zum Zusammenhang zwischen Lebererkrankungen und AQP-Expression. Die Forschung stützt sich bisher hauptsächlich auf Tiermodelle. Allerdings könnte die Rolle der AQPs bei der Karzinogenese, der Wundheilung und der

Beeinflussung der Zellproliferation die Grundlage für weitere Therapieansätze oder als diagnostische Marker bilden.

In einer Studie an Mäusen bewirkten Leberverletzungen eine gesteigerte AQP3-Synthese in den Makrophagen der Hepatozyten. Als Transportkanal für H2O2 erhöhte AQP3 den oxidativen Stress für umliegende Zellen. Zudem aktivierte AQP3 weitere proinflammatorische Prozesse und führte zur Einwanderung von Fibroblasten und konsekutiv zu einem bindegewebigen Umbau des Lebergewebes. Bei AQP3-Knockout-Mäusen bzw. Mäusen, die einen AQP3-Inhibitor erhalten hatten, war die Entzündungsreaktion, die Fibrogenese und die Progression der Fibrose deutlich geringer ausgeprägt. Allerdings fehlen bislang geeignete Medikamente, da alle bisher getesteten Inhibitoren Metalle wie Quecksilber, Kupfer oder Gold enthalten. (Hara-Chikuma et al., 2020)

Bei der im Vergleich zur AKPKD seltener vorkommenden Polyzystischen Lebererkrankung (PCLD) handelt es sich ebenfalls um einen autosomal-dominant vererbbaren Gendefekt mit multipler Zystenbildung. (Dettmer, 2016) Im Gegensatz zu vorangegangenen Befunden kam es in einer Studie von Li et al. zu einer AQP1-Überexpression auf dem die Zysten auskleidenden Epithelgewebe und an den Cholangiozytenmembranen. Die AQP1-Überexpression korrelierte mit der Zunahme der Zystengröße. (Li et al., 2016) Vermutlich beruhen die widersprüchlichen Befunde auf unterschiedliche Lokalisationen der AQP1-exprimierenden Gewebe. Hier wurde das Epithel, das die Zysten auskleidet, untersucht und in den Nieren der AKPKD-Patienten auch das umliegende Gewebe. Zusammenfassend scheint sowohl eine verstärkte als auch eine verminderte AQP1-Expression die Krankheitsprogression zu beeinflussen. (Li et al., 2016)

Das in Cholangiozyten exprimierte AQP1 ist an der Synthese der Gallenflüssigkeit beteiligt. Die wässrige Flüssigkeit enthält Gallensäuren, Lecithin, Cholesterin und andere Abbauprodukte der Leber. Unter basalen Bedingungen liegt AQP1 in Vesikeln gespeichert im Zytoplasma vor. Nach Stimulation durch Verdauungsenzyme (z. B. Sekretin) bildet AQP1 mit weiteren Proteinen an der Plasmamembran der Cholangiozyten einen Transportkomplex, der die Gallensekretion ins Lumen der Gallenkanälchen ermöglicht. Zudem wird AQP1 im Endothel der peribiliären Gefäße exprimiert, was

möglicherweise den Wassertransport vom Plasma zur Galle erleichtert. (Masyuk und LaRusso, 2006)

In einem Mausmodell der induzierten Cholestase wurde bestätigt, dass eine Steigerung der AQP-Synthese in den biliären Kanalikuli eine vermehrte Wasserpermeabilität zur Folge hat. Die Verbesserung der Cholestase nach AQP1-Synthesesteigerung stellt einen möglichen Therapieansatz dar. (Marronne et al., 2014)

Mit Sepsis wird ein klinisches Syndrom bezeichnet, bei dem komplexe physiologische und biochemische Veränderungen nach einer Infektion häufig zu einem fatalen Verlauf führen. Trotz intensiver Forschung existiert bis heute keine spezifische Therapie. (Weis et al., 2017) An den immunologischen Prozessen, die die Inflammationsreaktion aufrechterhalten, sind nach Rump und Adamzik (2018) AQP1, AQP3, AQP5, AQP7 und AQP9 beteiligt. Diese AQPs sind essentiell für die Funktion der T-Lymphozyten und die Migration von Immunzellen. Der verstärkte Wassereinstrom an der apikalen Seite der Membranen verändert den Konzentrationsgradienten und führt durch nachfolgende Aktin-Polymerisierung zu Lamellipodienbildung und damit zur Migration der Makrophagen. In aktivierten T- und B-Lymphozyten werden die genannten AQPs ebenfalls exprimiert.

AQP3-Knockout-Mäuse zeigten in einem Sepsis-Modell nach Peritonitis eine signifikant verminderte Migration von Makrophagen und T-Lymphozyten und eine höhere Mortalität. Vermutlich ist in diesem Kontext die Funktion von AQP3 als H2O2-Kanal von Bedeutung, da H2O2 für die chemokin-abhängige T-Zell-Migration erforderlich ist. (Rump und Adamzik, 2018)

Im Rahmen der Sepsis kann es zum akuten oder subakuten Leberversagen kommen. Symptome sind eine Koagulopathie, Cholestase und eine hepatische Enzephalopathie. Vermutlich resultiert die Aggravierung der Cholestase aus einer verminderten AQP-Expression (AQP8). Die Wasserpermeabilität der Hepatozyten sinkt, es wird weniger Galle gebildet und die Cholestase somit verschlimmert. Zudem reguliert AQP8 die hepatozelluläre Mitochondrienfunktion. Bei einem Funktionsverlust kann es zu Nierenschäden und zu einer verminderten AQP2- und AQP3-Expression kommen. Auch hier ergeben sich therapeutische Ansatzpunkte zur Verbesserung des Outcomes nach einer Sepsis. (Rump und Adamzik, 2018)

Weiter entwickeln Patienten mit prolongierten septischen Schocks in bis zu 50 % der Fälle eine kardiale Dysfunktion, deren zugrundeliegende Mechanismen noch nicht vollständig erforscht sind. Es wird jedoch vermutet, dass eine erhöhte AQP1-Expression zu Funktionsbeeinträchtigungen bis hin zum Funktionsverlust der Mitochondrien führt. Die konsekutiv sinkende Energieversorgung des Myokards hat eine relative Herzinsuffizienz zur Folge. Laut Studien an Mäusen ist die AQP1-Expression in kardialem Gewebe nach septischem Schock erhöht. (Rump und Adamzik, 2018)

2019 postulierten Wang et al., dass eine AQP3-Überexpression die Prognose beim hepatozellulären Karzinom verschlechtert. AQP3 wirkt in diesem Kontext als Onkogen und aktiviert die Transkription weiterer, die Zellproliferation fördernde Signalwege. Als H_2O_2-Kanal fördert AQP3 die Migration und Invasion der Zellen. Der Grad der AQP3-Expression korreliert mit einem höheren TNM-(Primärtumor-Lymphknotenbefall-Metastasen)-Stadium, einer schnelleren Metastasierung und einer schlechteren Prognose. Derzeit wird untersucht, ob AQP3 als Screening-Parameter geeignet ist, um die Prognose des hepatozellulären Karzinoms zu verbessern. (Wang et al., 2019b)

Bei einem Befall mit Plasmodium falciparum steigt die AQP3-Expression in den Hepatozyten und konsekutiv die Replikation der Parasiten. Eine geringere AQP3-Expression führt zu einer signifikanten Abnahme der Parasitenlast. Auch aus diesen Befunden lassen sich möglicherweise therapeutische Ansatzpunkte für AQP3-Inhibitoren ableiten. (Posfai et al., 2018)

4.2.3 Expression von Aquaporinen bei kardialen Vorerkrankungen

Die AQP-Expression im humanen kardialen Gewebe ist bisher kaum erforscht. Verschiedene Studien mit Mäusen und Ratten belegen variable Expressionsmuster in Abhängigkeit von der Spezies, dem Lebensalter und dem Geschlecht. AQPs (AQP 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10 und 11) werden im humanen Herz exprimiert. In immunhistochemischen Untersuchungen wurden AQP1, 4 und 7 im humanen Endokard und im Endothel der Kapillaren nachgewiesen, AQP1 und 4 auch in humanen Kardiomyozyten. (Verkerk et al., 2019) Sie sind mit Erkrankungen wie der Hypertonie und der Atherosklerose assoziiert.

Die Expression von AQPs am menschlichen Herzen ist bisher wenig erforscht. Studien stützen sich vorwiegend auf Versuche an Mäusen und Ratten, wobei bereits festgestellt

wurde, dass das Expressionsmuster in kardialem Gewebe zwischen den Spezies stark schwankt und auch abhängig von Lebensalter und Geschlecht ist. Dennoch ist bewiesen, dass die Aquaporine 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10 und 11 auch am menschlichen Herzen exprimiert werden. Weitere immunhistochemische Untersuchungen haben ergeben, dass sowohl im humanen Endokard als auch im Endothel der Kapillaren AQP 1, 4 und 7 lokalisiert sind. In humanen Kardiomyozyten wurden AQP1 und 4 nachgewiesen (Verkerk et al., 2019). Sie sind mit der Entstehung von Atherosklerose, der Hypertonie sowie dem kardialen Ödem nach Myokardinfarkt assoziiert. (Miller, 2014, Rutkovskiy et al., 2013a, Tie et al., 2017)

Der Myokardinfarkt ist eine der häufigsten akuten Erkrankungen des Herzkreislaufsystems. Die Lebenszeitprävalenz liegt in der Altersgruppe der 40-79jährigen bei 4,7 %, die Krankenhaussterblichkeit beträgt 4-12 %. (Gößwald et al., 2013) Die AQP1-Expression scheint eine Rolle für die molekularen Veränderungen beim Myokardinfarkt zu spielen. AQP1 ist nach einem Myokardinfarkt an der Angiogenese im Herzgewebe beteiligt. (Ran et al., 2010) Die Kapillardichte beeinflusst das Wachstum der Kardiomyozyten. Eine Stimulation des Kapillarwachstums durch Steigerung der AQP1-Expression führt zu einer kardialen Hypertrophie. Eine Studie fand nach einer myokardialen Ischämie eine verringerte AQP1-Expression im kardialen Endothel und folglich eine verminderte Angiogenese im Infarktareal und eine schlechtere Mikrozirkulation. Somit beeinträchtigte eine Hypoxie die Angiogenese im Herzen. (Rutkovskiy et al., 2013b)

Neuere Studien widersprechen den bisherigen Ergebnissen. Laut Li et al. (2015) erhöht sich in der Frühphase des Infarktes die AQP1-Expression, wodurch sich aufgrund des vermehrten Wasserflusses kardiale Ödeme ausbilden. Bei einer gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität fließt Wasser aus dem Intravasalraum über AQPs ins Interstitium. Die verlängerte Diffusionsstrecke des Sauerstoffs verschlimmert die Ischämie und verstärkt den Zelluntergang. Weitere Proteine wie der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF)-alpha beeinflussen die AQP-Spiegel, die bei einer Ischämie erhöhten Spiegel von HIF-alpha führen konsekutiv zu einer verstärkten AQP1-Expression. AQP1-Knockout-Mäuse zeigen kleinere Infarktareale, kleinere kardiale Ödeme und niedrigere

Apoptoseraten. Daher lässt sich die Inhibition der AQP1-Expression nach Myokardinfarkt potentiell auch therapeutisch einsetzen. (Li et al., 2015)

Studien an Mäusen belegen zudem abweichende Expressionsmuster von AQP1 und AQP6 im zeitlichen Verlauf nach einem Myokardinfarkt. Die Expression von AQP1 und AQP6 stieg an und blieb bis zu vier Wochen nach dem Ereignis erhöht. Zudem korrelierte die Expression von AQP4 mit dem Ausmaß der kardialen Dysfunktion und dem myokardialen Ödem. AQP1-Knockout-Mäuse hatten einen niedrigeren systolischen Blutdruck, ein geringeres Herzgewicht (bedingt durch ein geringeres Volumen der Kardiomyozyten), ein geringeres maximales HZV und eine geringere Kapillardichte. Der Cholesterin-Senker Simvastatin unterdrückte die AQP1-, 4-, 8- und 9-Expressionssteigerung. (Al-Samir et al., 2016, Li et al., 2015, Rutkovskiy et al., 2013a, Verkerk et al., 2019)

Die AQP3-Expression scheint bei der myokardialen Ischämie dagegen keine Rolle zu spielen. Nach einer kardialen Ischämie zeigten Mäuse mit und ohne AQP3-Expression vergleichbare Infarktarealgrößen, myokardiale Enzymspiegel und Überlebenswahrscheinlichkeiten. (Li et al., 2015)

Eine Wasserrestriktion führte in Rattenherzen zu einer verstärkten AQP1-Expression in Kardiomyozyten. Über eine AQP1-Expressionssteigerung kann der Organismus auch bei einer Dehydration den kardialen Volumenstatus konstant halten. (Netti et al., 2016)

Ratten, bei denen mittels Clipping der Nierenarterien eine chronische Hypertonie erzeugt wurde, zeigten eine deutliche Steigerung der AQP1-Expression im Vergleich zu normotensiven Ratten. Dabei handelte es sich vermutlich um eine Kompensationsreaktion auf die Hypertonie, da die AQP-Expression über eine erhöhte NO-Freisetzung zur Dilatation der Gefäßwand und damit zur Senkung des Blutdrucks führte und durch den vermehrten transmuralen Wasserfluss die Dehnung der Gefäße weiter reduzierte. Möglicherweise bietet AQP1 einen therapeutischen Ansatz bei der Hypertonie. (Toussaint et al., 2017)

Auch die Funktion als NO-Kanal prädestiniert AQP1 als Angriffspunkt für eine antihypertensive Therapie. NO beeinflusst verschiedene, an der Regulation des Blutdrucks beteiligte Vorgänge. In den Gefäßen wirkt NO über die Senkung der

Wandspannung als potenter Dilatator vor allem des arteriellen Systems; in der Niere beeinflusst es die Natrium- und Wasserausscheidung. Dies lässt die Vermutung zu, dass dies ein Angriffspunkt in der antihypertensiven Therapie sein könnte. Stickstoffmonoxid reguliert verschiedene Vorgänge, die an der Regulation des Blutdrucks beteiligt sind: in den Gefäßen wird NO aus Arginin synthetisiert und wirkt über die Senkung der Wandspannung als potenter Dilatator vor allem des arteriellen Systems, in der Niere beeinflusst es in die Natrium- und Wasserausscheidung. (Herrera et al., 2006)

4.3 Heat-shock-Proteine

Gefährdete Personengruppen wie Demenzkranke, Wohnsitzlose, Unfallopfer und Alkoholiker besitzen ein höheres Risiko für einen Tod durch Hypothermie. Bereits eine einmalige Ethanol- Exposition induziert die HSP-Expression. Die gesteigerte HSP-Synthese bei einer akuten bzw. chronischen Alkoholintoxikation dient dem Schutz von Lipiden vor einer oxidativen Degradation, der Verhinderung der Bildung freier Radikale und dem Schutz der Neuronen vor Apoptose. (Toth et al., 2010)

In der vorliegenden Studie zeigten die analysierten HSPs ein differierendes Expressionsmuster. Im kardialen Gewebe war die HSP60- und HSP70- Expression im Hypothermiekollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant erhöht. Allerdings wurde für beide HSPs in weniger als 10 % der Fälle im Hypothermiekollektiv eine Expression nachgewiesen. Im Kontrollkollektiv trat in keinem Fall eine HSP60- und HSP70- Expression auf. Die HSP27- Expression war zwischen Hypothermie- und Kontrollkollektiv nicht signifikant verschieden.

In der Leber wurden alle drei HSPs im Hypothermiekollektiv signifikant stärker exprimiert. Keiner der Patienten des Kontrollkollektivs zeigte eine HSP27- und HSP70- Expression.

In den Nieren war die Expression keines der drei untersuchten HSPs ausschließlich auf das Hypothermiekollektiv beschränkt. Die Gewebeproben des Kontrollkollektivs zeigten sogar eine tendenziell stärkere HSP60- Expression. Die Befunde lassen sich durch die konstitutive Synthese bei von HSP60 in der Niere unter physiologischen Bedingungen erklären. Patienten mit einer Hypothermie als Todesursache zeigten eine signifikant höhere HSP27- und HSP70- Expression.

Da eine gesteigerte HSP- Expression eine Reaktion auf Umwelteinflüsse wie ultraviolette Strahlung, Hitze oder Ethanol darstellt, sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation überprüft werden, ob auch Hypothermie zu diesen Faktoren zählt. Allerdings gibt es auch zahlreiche Vorerkrankungen, die die HSP- Expression beeinflussen können.

4.3.1 HSP-Expression bei kardialen Vorerkrankungen

Herzinsuffizienz beschreibt ein klinisches Syndrom, bei dem das Pumpvermögen des Herzens nicht ausreicht, Sauerstoffangebot und -nachfrage der Organe im Gleichgewicht zu halten. Die Prävalenz in der Bevölkerung liegt bei 1-2 %, allerdings gehen 10,3 % aller Sterbefälle des Jahres 2020 auf Herzinsuffizienz zurück. (stat. Bundesamt) Die bei einer Herzinsuffizienz auftretenden Funktionsstörungen der Ventrikel werden z. B. durch eine Koronare Herzerkrankung (KHK), einen Myokardinfarkt, eine Myokarditis oder Kardiomyopathien verursacht.

In Zellen, die aufgrund dessen oxidativem Stress ausgesetzt sind, kommt es häufiger zur Fehlfaltung von Proteinen, die sich in den Kardiomyozyten anhäufen. Einige dieser fehlgefalteten Proteine sind toxisch und verstärken die myokardiale Dysfunktion. Die Aufgabe von HSP70 besteht darin, diese fehlgefalteten Proteine in ihre ursprüngliche Konfiguration zurück zu falten oder, wenn dies nicht gelingt, die Proteine dem Abbau im Proteasom zuzuführen. Eine Hypoxie wirkt als Induktor der HSP70-Expression, Mäuse mit einer hohen HSP-70-Expression zeigten eine verbesserte postischämische Erholung und eine geringere Infarktgröße. Eine Blockade der HSP70-Expression erhöhte die Kardiomyozytenschäden und Apoptoserate. Damit spielt die HSP70-Expression eine wichtige Rolle beim Schutz vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz. (Ranek et al., 2018)

Bei einer chronischen Herzinsuffizienz schützt die gesteigerte HSP70-Expression das Herz vor den Auswirkungen der fortwährenden Ischämie. Eine verminderte Synthese des Proteins ist mit einer verminderten Kontraktionsfähigkeit des Herzens assoziiert. Bisher wird die Diagnose häufig erst beim Auftreten oder bei Progression von Symptomen (z. B. Leistungsminderung, Dyspnoe, Ödeme) gestellt; zu diesem Zeitpunkt sind die zellulären Prozesse jedoch meist bereits irreversibel fortgeschritten. Ähnlich wie erhöhte Spiegel des Pro-brain-natriuretic-Peptide (BNP) lassen sich erhöhte HSP70-Spiegel bereits in früheren Stadien der Erkrankung nachweisen. Damit ließe sich HSP70 bei einer

chronischen Herzinsuffizienz als diagnostischer Marker, aber auch als Verlaufskontrollparameter zur Anpassung von Therapien nutzen. (Li et al., 2013)

Laut einer Studie erhöht eine verminderte HSP27-Expression bei Patienten mit Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis das Risiko für Vorhofflimmern. Vermutet wird, dass HSP27 durch Hemmung von Cytochrom C anti-apoptotisch wirkt und durch eine Förderung der Glutathion-Produktion die Regenerationsfähigkeit der Kardiomyozyten verbessert. Patienten mit einer hohen HSP27-Expression leiden seltener an Vorhofflimmern und bleiben nach Kardioversion eher im Sinusrhythmus als Patienten mit niedriger Expression. Somit scheinen hohe HSP27-Expressionsraten einen relativen Schutz vor Vorhofflimmern und atrialem Remodeling zu bieten. (Wu et al., 2015)

Während eines akuten Myokardinfarkts steigt die HSP27-Expression in menschlichen Thrombozyten und das Protein wandert vom Zytoplasma in Richtung Membran. Das durch Phosphorylierung aktivierte HSP27 vermittelt seine anti-inflammatorische Wirkung über die Freisetzung des anti-entzündlichen Interleukins (IL)-10. IL-10 verhindert eine exzessive Entzündungsreaktion nach myokardialer Ischämie und hemmt pro-apoptotische Signalwege. Durch die Stabilisierung des Zytoskeletts wird die Exozytose inflammatorischer Zytokine inhibiert. Der anti-inflammatorische Effekt von HSP27 beruht zusätzlich auf einer Inhibition der Proteinbiosynthese. (Kraemer et al., 2019)

Auch in Kardiomyozyten steigt nach einem Myokardinfarkt die HSP27- und HSP70-Expression leicht an. Vermutet wird eine immunmodulatorischen Funktion bei der Entzündungsreaktion. (Genneper, 2016)

HSP27 scheint bei atherosklerotischen Prozessen der Gefäße eine Schlüsselrolle zu spielen. In einer Studie neigten Mäuse mit HSP27-Überexpression weniger zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques, außerdem war der Cholesteringehalt, die Größe der Plaques sowie die Adhäsion von Makrophagen an die geschädigte Gefäßwand in diesen Tieren signifikant geringer als im Kontrollkollektiv. Vermutlich führt HSP27 dazu, dass sich Makrophagen schlechter an Plaques anlagern und eindringen können und weniger Cholesterin aufnehmen, so dass weniger Schaumzellen gebildet werden. Außerdem scheint die veränderte Zusammensetzung auch die Stabilität der Plaques zu verbessern und damit das Risiko einer Ruptur zu vermindern. Eine hohe HSP27-

Expression wirkt somit anti-atherogen. (Cuerrier et al., 2013, Rodriguez-Iturbe und Johnson, 2018)

In der Niere steigt die Expression von HSP70-Expression von der Rinde bis zum Nierenmark kontinuierlich an. Bei diabetischen Patienten mit anhaltend hohen Glucose-Spiegeln hat die HSP70-Überexpression in den rindennahen Glomeruli, Tubuli und interstitiellen Fibroblasten in den frühen Stadien der Erkrankung eine zytoprotektive Wirkung, da pro-apoptotische Signalwege unterdrückt werden. Kommt es aber bei fortschreitender Nierenschädigung zu einer Albuminurie, scheint HSP70 dagegen über eine Aktivierung inflammatorischer Zytokine sowie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren die tubulointerstitielle Schädigung zu verstärken. (Bellini et al., 2017)

Bei einer diabetischen Neuropathie kommt es zu segmentalen Myelinscheiden Verlusten, Axondegeneration und Ausbildung großer Vakuolen im Zytoplasma. Durch eine verstärkte HSP70-Expression lässt sich die mitochondriale Funktion und die Toleranz gegenüber oxidativem Stress verbessern. (Bellini et al., 2017)

4.3.2 HSP-Expression bei hepatischen Vorerkrankungen

Scheinbar nimmt die HSP-Expression mit steigendem Lebensalter ab. Die sinkende Toleranz der Zellen gegenüber thermischen oder chemischen Reizen führt zu einem gesteigerten Zelluntergang. (Heydari et al., 1993 Kregel, 2002)

Eine verstärkte HSP70-Expression kann auch als Antwort auf ein physisches Trauma im Sinne einer Akute-Phase-Antwort verstanden werden. Mit einer Fototherapie behandelte Mäuse mit Lebertumoren zeigten bereits eine Stunde nach der Therapie eine verstärkte Expression von HSP70 und weiterer Mediatoren in der Leber. Das Ziel dieser Reaktion ist die Isolation und Beseitigung von geschädigter und toter Zellen. Nicht nur der Reiz wirkt induzierend auf die HSP-Expression, auch andere Zytokine der Kaskade (Interleukin-(IL)-6) und aus der Nebenniere freigesetzte Glukokortikoide beeinflussen die Synthese auf Translationsebene. Vermutlich bindet das an sterbende Zellen anhaftende HSP70 Immuneffektorzellen und treibt so die Phagozytose voran. (Merchant und Korbelik, 2011)

Weiter dienen HSP der Aufnahme von Lipiden in die Leber. Eine vermehrte HSP-Expression in der Leber durch einen thermischen Reiz führte in Mäusen zu einer

vermehrten Aufnahme von Lipiden in die Hepatozyten und zu einer erhöhten Expression die Lipogenese fördernder Gene. Die Lipide konnten die Hepatozyten nicht mehr verlassen, wurden zu Triglyzeriden verestert und akkumulierten; es entstand eine Fettleber. In HSP70-Knockout-Mäusen war die Aufnahme von Lipiden in die Hepatozyten signifikant geringer, außerdem kam es aufgrund der pro-inflammatorischen Funktionen des HSP70 seltener zu einer Steatohepatitis (Zhang et al., 2018).

Die Entstehung einer Fettleber lässt sich auf verschiedene Ursachen zurückführen; am Häufigsten ist ein übermäßiger und fortgesetzter Alkoholkonsum verantwortlich. Weiter ist eine Fettleber mit dem metabolischen Syndrom und Diabetes mellitus Typ II assoziiert (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD). Zugrundeliegende Mechanismen sind eine erhöhte Triacylglycerin-Akkumulation in den Hepatozyten und daraus resultierend eine ballonierte Degeneration und Zelluntergang mit begleitender Entzündung (Herold, 2015). Die Ballonierung ist auf eine Verletzung des Zytoskeletts zurückzuführen; degenerierte Zellen zeigen eine verminderte Expression des für die Stabilisierung der Aktinfilamente verantwortlichen HSP27. Laut Sookoian et al. (2016) korreliert das Ausmaß des metabolischen Stresses (in Form einer gestörten Insulin-Toleranz und hoher Glukose- und Lipidspiegel im Serum) negativ mit der HSP27-Expression. HSP27 schützt Hepatozyten damit vor Degeneration und fördert die Toleranz der Zellen gegenüber oxidativem Stress (Sookoian et al., 2016).

Auch bei der Leberfibrose und -zirrhose spielen HSPs eine wichtige Rolle. Häufig treten diese Erkrankungen nach langjährigem Alkoholabusus oder chronisch verlaufenden Hepatitiden auf. Durch nekrotische Veränderungen werden pro-inflammatorische Zytokine synthetisiert und Makrophagen sowie Granulozyten rekrutiert, die zu einem bindegewebigem Umbau der Läppchen- und Gefäßstruktur mit daraus resultierender Funktionsbeeinträchtigung bis hin zum Funktionsverlust führen (Herold, 2015). Eine durch oxidativen Stress und geschädigte Hepatozyten gesteigerte HSP-Expression stimuliert Wachstumsfaktoren, die die Kollagen-Synthese fördern. Weiter sind HSPs mit für die Akkumulation von Fibroblasten im Lebergewebe und deren Aktivierung zu Myofibroblasten verantwortlich. Eine Hemmung der HSP-Expression führt zu einem geringeren Kollagenfaser-Gehalt und einer Sistierung des Fibroseprozesses (Rizk et al., 2013).

Eine mögliche Spätfolge der Leberzirrhose ist das hepatozelluläre Karzinom. In diesem Kontext sind HSPs nicht nur an der Tumorgenese beteiligt, sondern spielen auch bei der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapien eine Rolle. In den deutschen Leitlinien fehlt derzeit eine Empfehlung für eine Zytostatika Therapie (Leitlinie AWMF, 2013). In Asien wird das FOLFOX-(Folinsäure+ 5-Flurouracil+ Oxaliplatin)- Schema verwendet. HSP27 hemmt die durch platinhaltige Zytostatika induzierte Apoptose und Phagozytose und fördert die Migration und Invasion von Tumorzellen in Nachbargewebe sowie die Metastasierung. Problematisch ist zudem, dass 5- Flurouracil in Hepatozyten zur HSP27-Induktion beiträgt. Eine HSP27-Überexpression ist beim hepatozellulären Karzinom mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (Wang et al., 2016)

4.3.3 HSP-Expression bei renalen Vorerkrankungen

In der Niere werden unter physiologischen Bedingungen alle HSPs exprimiert. Bei Einwirkung von Stress wird die Expression jedoch um bis zu 15 % gesteigert. Die bereits sechs Stunden nach einer Ischämie erhöhte HSP27-Expression unterdrückt Caspase-abhängige apoptotische Signalwege und stabilisiert die Aktin-Fasern des Zytoskeletts der Podozyten. Dadurch werden Nekrosen und Entzündungsreaktionen minimiert (Chebotareva et al., 2017).

Auch bei der Lupusnephritis ist die erhöhte HSP27-Expression in den betroffenen Tubuli als Reaktion auf zellulären Stress durch die Entzündungsreaktion zu sehen. Laut Tsagalis et al. (2006) ist bei einer akuten Nephritis die HSP27-Expression in den weniger betroffenen Tubuli besonders hoch. Vermutlich milder HSP27 die Entzündungsreaktion und schützt die tubulären Zellen vor der Aopotose (Tsagalis et al., 2006).

Unter physiologischen Bedingungen wird HSP60 in den proximalen und distalen Tubuli sowie in den Podozyten der Glomeruli exprimiert. Bei einer Nierenschädigung durch Toxine kommt es zu einer signifikanten Zunahme der HSP60-Expression im Zytosol der tubulären Zellen, die durch Unterdrückung des Bcl-2 associated X protein (BAX) Signalweges die Apoptose hemmt und das Überleben der Zelle sichert (O'Neill et al., 2013). Dieser Mechanismus lässt sich möglicherweise bei Erkrankungen, bei denen es zu einer exzessiven Apoptose kommt (z. B. ischämischer Insult), auch therapeutisch nutzen.

HSPs arbeiten nicht alleine, sondern bilden mit Co-Chaperonen Komplexe. Für die Rückfaltung fehlgefalteter Proteine bilden HSP40 oder HSP70 unter ATP-Zufuhr einen Komplex mit HSP90. Durch die wechselseitige Beeinflussung ihrer Expression gewährleisten HSPs ein Gleichgewicht zwischen Synthese, Strukturbildung und Abbau weiterer Proteine (Chebotareva et al., 2017).

Als „Gefahrensignal“ besitzen HSPs eine immunmodulatorische Funktion. Von verletzten oder nekrotischen Zellen freigesetzte HSPs werden von Antigen-präsentierenden Zellen gebunden. Die folgende Synthese pro-inflammatorischer Zytokine dient als Signal zur Aktivierung der Immunantwort. Für die einzelnen HSPs gibt es jedoch widersprüchliche Befunde. HSP60 wirkt pro-inflammatorisch, während HSP70 sowohl pro-als auch anti-inflammatorische Zytokine induziert. (Kim und Yenari, 2013, Musial und Zwolinska, 2011)

Die häufigste Form des Bluthochdrucks ist die primäre Hypertonie. Obwohl die Ursachen nicht gänzlich verstanden sind, belegen einige Studien, dass in der Mehrzahl der Fälle eine Beeinträchtigung der Natrium-Ausscheidung verantwortlich ist. Im Interstitium der hypertensiven Niere sammeln sich immunkompetente Zellen an. Die Entzündung verursacht oxidativen Stress und erhöht die Angiotensin-II-Konzentration. Die daraus resultierende lokale Vasokonstriktion beeinträchtigt die Drucknatriurese und trägt so zur Entstehung der Hypertonie bei. Vermutlich führt bei diesem Geschehen eine HSP70-Überexpression zu einer Autoimmunreaktion und Entzündung. (Pons et al., 2013)

Tabelle 12 Heat-Shock-Protein-Expression in der Niere- Lokalisation und assoziierte Erkrankungen

HSP-Isoform	Lokalisation	Erkrankungen
HSP27	Aktinfasern der Podozyten, Tubuli, Endothel	Akutes Nierenversagen, diabetische Nephropathie, Lupusnephritis
HSP60	Podozyten, Tubuli des äußeren Nierenmarks, Makrophagen	Akutes Nierenversagen, diabetische Nephropathie, Abstoßungsreaktion von Transplantaten
HSP70	Mesangiumzellen, Tubuli, Makrophagen	Akutes Nierenversagen, diabetische Nephropathie, chronische Glomerulonephritis, tubulo-interstitielle Nephritis

(Barutta et al., 2008, Guo et al., 2014, Hernandez-Pando et al., 2005, Matsumoto et al., 2015, O'Neill et al., 2013, Sanchez-Nino et al., 2012, Tsagalis et al., 2006, Venkataseshan und Marquet, 1996, Vidyasagar et al., 2013)

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass es in Herz und Leber im Studienkollektiv insgesamt zu einer höheren Expression der Aquaporine und der Hitzeschockproteine kam als in der Kontrollgruppe. Für die untersuchten Nieren lässt sich diese Aussage nicht für alle Proteine treffen, da in der Kontrollgruppe für AQP3 und HSP60 eine höhere Expression als in der Studiengruppe nachgewiesen wurde. Weiterhin ist inzwischen bekannt, dass nicht nur Hypothermie zur Expressionssteigerung von Aquaporinen und Hitzeschockproteinen beiträgt. Sie können daher nicht als spezifische Marker herangezogen werden, aber durchaus als Ergänzung zu weiteren Untersuchungen beitragen.

Für zukünftige Studien könnte es von Interesse sein, ob es weitere Proteine bzw. andere Isoformen der Aquaporine gibt, die als spezifische Marker für eine Hypothermie infrage kommen. Auch konnte in dieser Dissertation nicht untersucht werden, inwieweit das Ausmaß der Hypothermie (also milde, moderate oder tiefe Hypothermie) und die Überlebenszeit nach stattgefundener Hypothermie die Expression der Aquaporine beeinflusst. Sonna et al. vermuteten 2010, dass die Expression von Hitzeschockproteinen nach Hypothermie erst dann ansteigt, wenn eine Wiedererwärmung stattfindet und nicht durch den Kältereiz selbst. (Sonna et al., 2010) Diese Ergebnisse konnten hier nicht bestätigt werden, da die Kontrollgruppen fast durchgängig negativ waren, während im Studienkollektiv eine Steigerung der Expression beobachtet wurde. Auch hier können zukünftige Untersuchungen möglicherweise zur weiteren Entschlüsselung der biochemischen Prozesse beitragen.

Da Aquaporine und Hitzeschockproteine ubiquitär im menschlichen Körper lokalisiert sind und vielfältige Funktionen ausüben, ergeben sich daraus verschiedene Untersuchungsmöglichkeiten. Möglicherweise können sie zukünftig bei Tumorerkrankungen, Hypertonie, Myokardinfarkt, Diabetes insipidus und vielen weiteren Erkrankungen als diagnostisches Instrument, Screeningparameter oder Ansatzpunkt für

medikamentöse Therapien infrage kommen. Es ist inzwischen bekannt, dass die Funktionen der Aquaporine über ihr bloßes Dasein als Wasserkanal hinausgehen, dennoch ist ihre genaue Arbeitsweise noch längst nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller Forschung.

Auch wäre es denkbar, dass die Auswirkungen von Hypothermie auf die Expression der Aquaporine und Hitzeschockproteine an verschiedenen weiteren Organen untersucht wird. Im Rahmen dieser Dissertation wurde zwischen Herzen, Lebern und Nieren ein differierendes, organabhängiges Expressionsmuster gefunden.

Zhang et. al untersuchten 2019 den Einfluss von milder Hypothermie auf die Expression von AQP4 im Gehirn und die Ausbildung eines Hirnödems. Möglicherweise können solche Studien auch dazu beitragen, die molekularen Mechanismen der Hypothermie weiter aufzuklären und auf ihren therapeutischen Nutzen hin zu überprüfen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es eine Vielzahl akuter und chronischer Vorerkrankungen gibt, die die AQP-Expression beeinflussen. Aufgrund des Vorkommens in verschiedenen Organen und der variablen Aufgaben neben der Funktion als Wasserkanal hat die Zahl der AQP-Analysen in den vergangenen Jahren stark zugenommen. Häufig handelt es sich dabei aber um Studien am Tiermodell. Diese Erkenntnisse lassen sich nur bedingt auf das humane System übertragen, da sich die Expression in verschiedenen Spezies deutlich unterscheidet. Die im Tiermodell nachgewiesenen schwankenden AQP-Spiegel in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht wurden beim Menschen bisher noch nicht untersucht, stellen aber einen möglichen Forschungsansatz für die Zukunft dar. Aufgrund der Vielzahl die AQP-Expression beeinflussender Faktoren ist die Aussagekraft der Proteine als spezifische Marker für eine Hypothermie gering. Als Ergänzung zu weiteren Untersuchungen (z. B. Leichenschau, Obduktion, Anamnese, Auffindesituation) sind sie aber geeignet, eine Diagnose zu erhärten. In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass an Hypothermie Verstorbene im Gegensatz zu an anderen Ursachen Verstorbene in einigen Fällen eine gesteigerte AQP1- und AQP3-Expression in der Leber und im Herzen aufweisen. Bei der Interpretation der Befunde ist aber zu berücksichtigen, dass andere Ursachen für die AQP-Expressionssteigerung nicht ausgeschlossen werden konnten.

5 Zusammenfassung

Die Todesursachenermittlung spielt in der Rechtsmedizin eine elementare Rolle. Die Sicherung einer Hypothermie als Todesursache ist bisher schwierig. Vielfach bleibt der Tod durch Unterkühlung unter Berücksichtigung der Auffindesituation, bei der Obduktion erhobener makro- und mikroskopischer Befunde und der Vorgeschichte eine Ausschlussdiagnose. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse von möglichen Expressionsänderungen der Aquaporine (AQP) 1 und 3 sowie der Hitzeschockproteine (HSP) 27, 60 und 70 unter dem Einfluss von Kälte.

Das Hypothermiekollektiv setzte sich aus 51 Fällen zusammen, das Kontrollkollektiv umfasste 48 Todesfälle ohne thermische Beeinflussung. Proben von Herzen, Lebern und Nieren der Verstorbenen wurden in Formalin fixiert und asserviert. Die Proben wurden mittels Hämatoxylin- Eosin und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen AQP1, AQP3, HSP27, HSP60 und HSP70 analysiert. Bestimmt wurde der Anteil der Verstorbenen mit einer AQP- bzw. HSP- Expression in den Organen. Bei positivem Befund wurde zusätzlich der Anteil der AQP- und HSP- positiven Fläche von der Gesamtfläche sowie die Intensität der immunhistochemischen Färbung (negativ, niedrig positiv, positiv, hoch positiv) beurteilt.

Lediglich in einem Fall des Hypothermiekollektivs wurden keine Hypothermie-spezifischen makroskopischen Befunde (Wischnewski-Flecken, Kälteerytheme) nachgewiesen, bei den anderen Verstorbenen wurde mindestens eines der beiden Merkmale gefunden.

Es bestand eine schwach negative Korrelation zwischen Alter, Geschlecht bzw. Body-Mass-Index (BMI) und der Proteinexpression bei HSP27 sowie eine schwach positive Korrelation bei AQP3. Der BMI ist somit nicht geeignet, eine zuverlässige Vorhersage über eine hohe oder niedrige Proteinexpressionsrate zu treffen.

Die immunhistochemischen Analysen ergaben organspezifische Expressionsmuster der untersuchten Proteine. Im Hypothermiekollektiv wurden im Herzgewebe alle untersuchten Proteine exprimiert, während im Kontrollkollektiv lediglich eine HSP27- Expression (in 4,44 % der Fälle) beobachtet wurde. In den Lebern des Hypothermiekollektivs wurden

ebenfalls alle untersuchten Proteine exprimiert, im Kontrollkollektiv hingegen nur HSP60 (bei 4,65 % der Fälle).

In den Nieren wurden sowohl im Hypothermie- als auch im Kontrollkollektiv alle untersuchten Proteine exprimiert. Die Patienten des Kontrollkollektivs zeigten im Vergleich zu den Patienten des Hypothermiekollektivs häufiger eine AQP3- und HSP60-Expression. Im Hypothermiekollektiv trat dagegen häufiger eine AQP1-, HSP27- und HSP70- Expression auf. Die APQ1-, HSP27- und HSP70- Expression war in allen untersuchten Geweben im Hypothermiekollektiv stärker ausgeprägt als im Kontrollkollektiv.

Die vorliegenden Befunde belegen, dass die AQP- und HSP- Expression möglicherweise geeignet ist, die Verdachtsdiagnose Hypothermie bei der Todesursachenermittlung zu unterstützen, die Proteine als alleinige Marker aber nicht ausreichen, um die Hypothermie als Todesursache zweifelsfrei zu bestätigen. Eine Obduktion und gründliche Anamnese bleiben weiterhin unerlässlich. AQP3 und HSP60 wurden in der Niere des Kontrollkollektivs stärker exprimiert als im Hypothermiekollektiv und sind somit als Marker nicht geeignet. Eine fehlende AQP- bzw. HSP- Expression ist kein Ausschlusskriterium für einen Tod durch Hypothermie. Auch bei gesicherter Todesursache zeigten Patienten des Hypothermiekollektivs häufig negative Befunde. Bei der Interpretation der Befunde muss berücksichtigt werden, dass zahlreiche Faktoren die HSP- und AQP- Expression sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können.

In zukünftigen Studien sollte überprüft werden, ob sich die Expression anderer AQP- und HSP- Isoformen bzw. die Expression der Proteine in anderen Organen möglicherweise besser als Marker für eine Hypothermie eignet. Eine weitere interessante Fragestellung ist der Einfluss der Dauer und die Intensität der Kälteexposition auf die AQP- und HSP-Expression.

6 Anhang

Tabelle 13 Todesursachen im Kontrollkollektiv

Fall	Geschlecht	Alter (Jahre)	Todesursache	BMI (kg/m$^{2)}$
1	M	60	Myokardinfarkt	31,93
2	M	100	Colitis in Kombination mit Pneumonie	24,39
3	W	71	Intoxikation mit Tabletten	23,44
4	M	45	Myokardinfarkt	33,51
5	M	58	Hämorrhagische Pankreatitis	33,08
6	W	85	Sepsis, auf dem Boden eines Dekubitus	18,05
7	M	68	Verbluten nach innen nach Polytrauma	19,37
8	W	73	Lungenembolie	23,07
9	M	72	Verbluten während einer Operation (Rektumresektion)	29,90
10	W	72	Burking	22,59
11	M	34	Ersticken durch Bolusgeschehen	19,87
12	M	22	Intoxikation mit Drogen	27,34
13	W	67	Perikardtamponade	22,14
14	W	40	Krampfanfall nach Intoxikation mit Opipramol	21,94
15	W	68	Lungenembolie nach tiefer Beinvenenthrombose, ausgelöst durch	40,15

			Immobilisation nach Sturz	
16	W	64	Ertrinken	30,44
17	W	80	Myokardinfarkt	33,32
18	W	83	Subdurales Hämatom	23,50
19	W	75	Erdrosseln	22,49
20	M	80	Lungenödem in Kombination mit Pleuraergüssen und Peritonitis	20,07
21	W	49	Hirnblutung (SAB mit Ventrikeleinbruch)	22,32
22	M	69	Verbluten nach außen	17,63
23	W	82	Dekompensierte Herzinsuffizienz	18,55
24	M	47	Lungenembolie	34,90
25	M	74	Myokardinfarkt	22,34
26	M	38	Intoxikation mit Drogen	22,26

27	M	38	Verbrennen / Intoxikation mit Rauchgas	30,86
28	W	80	Myokardinfarkt	27,64
29	W	7	Strangulation	20,73
30	W	69	Lungenembolie, ausgelöst nach Beinvenenthrombose	26,40
31	M	44	Myokardinfarkt	21,28
32	W	53	Lungenembolie	25,10
33	W	87	Verbluten nach innen	31,11
34	W	84	Dekompensierte Herzinsuffizienz in Kombination mit Ileus und beginnender Sepsis	29,24
35	M	30	Intoxikation mit Drogen	26,40
36	M	44	Akute Herzinsuffizienz	24,21
37	M	51	Makroskopisch unklar, wahrscheinlich Herz-Kreislauf-Dysregulation nach Narkoseeinleitung bei Lungenkarzinom	18,29

38	M	31	Intoxikation mit Drogen	28,34
39	M	73	Verbluten nach außen während Operation mit konsekutiver Blutgerinnungsstörung	36,06
40	M	76	Myokardinfarkt	32,08
41	W	63	Akuter Verschluss der A. carotis	24,03
42	W	46	Verbluten nach innen aufgrund von Ösophagusvarizen bei chronischem Alkoholabusus	39,96
43	W	76	Hypoxischer Hirnschaden	22,64
44	M	51	Perikardtamponade	30,39
45	M	25	Intoxikation mit Drogen	26,64
46	M	Unklar	Verbrennen	
47	M	61	Kardiomyopathie	38,20
48	M	49	Myokardinfarkt	34,11

BMI= Body Mass Index; M= männlich; W= weiblich

Tabelle 14 Hypothermiekollektiv – demografische Parameter, makroskopische Hypothermiezeichen und Organgewichte

Fall	Geschlecht	Alter (Jahre)	BMI (kg/m2)	Wisch-newski-Flecken	Kälte-ery-theme	Gewicht Herz (g)	Gewicht Leber (g)	Gewicht Nieren (g) (rechts/links)
1	M	76	33,2	X		550	1740	90 / 70
2	M	61	24,0	X	X	410	1960	120 / 150
3	M	58	27,7	X	X	880	1550	220 / 230
4	W	92	14,8	X	X	260	700	80 / 90
5	M	44	31,0			570	3100	210 / 200
6	W	44	23,4	X	X	290	1390	110 / 110
7	M	58	31,57	X	X	550	1920	170/ 190
8	M	9	15,08	X		91	514	44 / 48
9	M	44	19,66	X		210	1200	150/150
10	M	60	22,77		X	450	700	100 / 80
11	W	88	21,87		X	350	980	60/ 60
12	W	31	20,65	X		230	1060	80 / 90
13	W	57	22,48	X		380	1700	160 / 170
14	W	84	14,06	X	X	340	700	150 (Einzelniere rechts)
15	W	62	27,01	X		410	2230	150 / 170
16	M	89	19,72	X		570	1020	100 / 100
17	W	78	30,46	X		730	1430	170 / 170
18	W	80	20,02	X		510	1060	120 / 130
19	W	53	38,22	X		350	1990	135 / 140
20	M	61	25,82	X		820	1570	180 / 155
21	M	66	28,38	X		570	1570	170 / 150

22	M	71	29,60	X	X	530	1480	160 / 160
23	M	52	21,42	X		370	1290	110 / 120
24	M	76	19,70	X	X	520	1920	140 / 160
25	W	50	26,22	X		330	1870	155 / 90
26	W	71	48,06	X		510	1490	100 / 120
27	M	50	28,35		X	770	1910	190 / 200
28	W	97	27,23	X		450	1490	120 / 70
29	W	76	23,42	X		525	950	100 / 50
30	M	31	25,69	X		590	1690	120 / 140
31	W	81	22,40	X		370	800	110 / 130
32	M	87	19,60	X	X	250	950	120 / 120
33	W	71	17,89	X		385	1000	80 / 100
34	W	83	25,51	X	X	500	800	90 / 90
35	M	59	20,54	X		435	1180	115 / 110
36	W	84	28,65	X		580	1150	110 / 160
37	M	53	20,83	X	X	430	1200	100 / 100
38	W	88	21,05	X		360	980	150 / 130
39	M	77	15,57	X	X	330	1040	130 / 130
40	M	41	25,15	X	X	390	1390	140 / 150
41	W	66	26,48	X		500	540	110 / 80
42	M	58	23,19	X		400	1120	115 / 160
43	M	86	20,93	X	X	370	1400	210 (Einzelniere rechts)
44	M	57	27,44	X		460	2510	170 / 170
45	W	60	44,78	X		580	1580	140 / 95

46	M	24	30,09	X	X	380	3580	210 / 210
47	W	85	23,83	X	X	400	2150	180 / 170
48	M	83	17,10	X		280	940	80 / 120
49	M	84	27,39	X		450	1360	80 / 120
50	W	92	18,02	X	X	330	630	80 / 100
51	W	66	20,61	X	X	415	1560	170 / 190

M=männlich, W= weiblich, X=vorhanden

Tabelle 15 durchschnittliches Lebensalter, BMI, kritisches Herzgewicht, Organgewichte: Vergleich Hypothermie- vs. Kontrollkollektiv

	Hypothermiekollektiv	Kontrollkollektiv
Lebensalter	65,7 Jahre	58,91 Jahre
BMI	26,16 kg/m^2	26,16 kg/m^2
Überschreiten des kritischen Herzgewichts	11 Fälle	12 Fälle
Durchschnittliches Gewicht Herz	444,92 g	426,80 g
Durchschnittliches Gewicht Leber	1403,1 g	1125,95 g
Durchschnittliches Gewicht Nieren	130,62	104,52 g

Programmierungsprotokoll für den IHC-Profiler (ImageJ, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Maryland, USA)

// Set title as title + DAB Stain title = getTitle();

title = title + "-(DAB Stain)"; print(title);

width = getWidth(); parseInt(width, 10); height = getHeight(); parseInt(height, 10); print(width*height);

// change scale from inches to microns

run("Set Scale...", "distance=317 known=200 pixel=1 unit=um");

// higher brightness run("Brightness/Contrast..."); setMinAndMax(-29, 225);

// select the plugin IHC Profiler run("IHC Profiler",

"Nuclear Stained Image"); selectWindow(title);

// set threshold setAutoThreshold(); getThreshold(min, max) setThreshold(0, 153);

// select red structure run("Create Selection");

// measure red structure run("IHC Profiler Macro");

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Thermoregulation des Menschen aus Schmidt-Lang, 2007 8
Abbildung 2 allgemeines Strukturmodell der Aquaporine, nach Jung et al., 1994 24
Abbildung 3 Hypothermiekollektiv, AQP3-Expression in der Niere, Intensität „hoch positiv“ 41
Abbildung 4 Hypothermiekollektiv, AQP1-Expression in der Leber, Intensität „positiv“ 42
Abbildung 5 Hypothermiekollektiv, AQP-1-Expression des Herzens, Intensität „hoch positiv“ 43
Abbildung 6 Kontrollkollektiv, Niere, HSP-27-Färbung; Intensität „negativ“ 44
Abbildung 7 Vorliegen makroskopischer Befunde im Hypothermiekollektiv 46
Abbildung 8 Todeszeitpunkt nach Monaten im Hypothermiekollektiv 47
Abbildung 9 Anteil der Aquaporin 1 (AQP1) positiven Fläche des Herz-, Leber- und Nierengewebes im Hypothermie- und Kontrollkollektiv 48
Abbildung 10 Immunhistochemischer Nachweis von Aquaporin 1 (AQP1) in Herzgewebe (Vergrößerung: 1:400) 49
Abbildung 11 Immunhistochemischer Nachweis von Aquaporin 1 (AQP1) in Lebergewebe (Vergrößerung: 1:400) 50
Abbildung 12 Anteil der Aquaporin 3 -(AQP3) positiven Fläche des Herz-, Leber- und Nierengewebes im Hypothermie- und Kontrollkollektiv 51
Abbildung 13 Immunhistochemischer Nachweis von Aquaporin 3 (AQP3) in Nierengewebe (Vergrößerung 1:400) 52
Abbildung 14 Immunhistochemischer Nachweis von Aquaporin 3 (AQP3) in Nierengewebe (Vergrößerung 1:400) 53
Abbildung 15 Anteil der Heat-shock-Protein 27 (HSP27-) positiven Fläche des Herz-, Leber- und Nierengewebes im Hypothermie- und Kontrollkollektiv 54
Abbildung 16 Immunhistochemischer Nachweis von Heat-shock-protein 27 (HSP27) in Nierengewebe (Vergrößerung 1:400) 55
Abbildung 17 Anteil der Heat-shock-Protein 60 (HSP60) positiven Fläche des Herz-, Leber- und Nierengewebes im Hypothermie- und Kontrollkollektiv 56
Abbildung 18 Immunhistochemischer Nachweis von Heat-shock-protein 60 (HSP60) in Nierengewebe (Vergrößerung 1:400) 57

Abbildung 19 Anteil der Heat-shock-Protein 70 (HSP70) positiven Fläche des Herz-, Leber- und Nierengewebes im Hypothermie- und Kontrollkollektiv 58
Abbildung 20 Immunhistochemischer Nachweis von Heat-shock-protein 70 (HSP70) in Nierengewebe (Vergrößerung 1:400) 59

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1Systemische Reaktionen in Abhängigkeit von der Körperkerntemperatur (Klinke et al., 2005) 10
Tabelle 2 Überlebenszeit in Abhängigkeit der Wassertemperatur (Madea, 2003) 11
Tabelle 3Isoformen der Aquaporine (AQP)- Lokalisation, Aufgabe und assoziierte Erkrankungen 21
Tabelle 4Übersicht über Hypothermie- und Kontrollkollektiv, Fallzahlen, Geschlecht, Lebensalter, BMI und Anzahl der Organproben 31
Tabelle 5 Herkunft der Positivkontrollen für die immunhistochemische Analyse der Aquaporine (AQP) und Heat-shock-Proteine (HSP) 34
Tabelle 6 Verwendete Erst- und Zweitantikörper für die immunhistochemische Analyse der Aquaporine (AQP) und Heat-shock-proteine (HSP) 34
Tabelle 7 Aquaporin (AQP)- und Heat-shock-Protein (HSP)- Expression in Herz-, Leber- und Nierengewebe – Anteil positiver Proben 60
Tabelle 8 Aquaporin (AQP)- und Heat-shock-Protein (HSP)- Expression in Herz-, Leber- und Nierengewebe – Anteil der immunhistochemisch positiven Flächen und Färbeintensität 60
Tabelle 9 Korrelation zwischen exprimierten Proteinen und BMI der Verstorbenen des Hypothermiekollektivs 62
Tabelle 10 Vorerkrankungen der Verstorbenen des Hypothermie- und Kontrollkollektivs 63
Tabelle 11 AQPs- Lokalisation, Funktion und assoziierte Erkrankungen 66
Tabelle 12 Heat-Shock-Protein-Expression in der Niere- Lokalisation und assoziierte Erkrankungen 81
Tabelle 13 Todesursachen im Kontrollkollektiv 86
Tabelle 14 Hypothermiekollektiv – demografische Parameter, makroskopische Hypothermiezeichen und Organgewichte 90
Tabelle 15 durchschnittliches Lebensalter, BMI, kritisches Herzgewicht, Organgewichte: Vergleich Hypothermie- vs. Kontrollkollektiv 92

9 Literaturverzeichnis

Agarwal SK, Gupta A. Aquaporins: The renal water channels. Indian J Nephrol. 2008 Jul;18:95-100

Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, and Nielsen

S. Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine (2002). Journal of Physiology-London, 542, 3-16

Alberts B, Johnson AD, Lewis J, David M, Raff M, Roberts K, Walter P. Molekularbiologie der Zelle. 6. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH, 2017

Al-Sami S, Wang Y, Meissner JD, Gros G, Endeward V. Cardiac Morphology and Function, and Blood Gas Transport in Aquaporin-1 Knockout Mice. Front Physiol. 2016

Barutta F, Pinach S, Giunti S, Vittone F, Forbes JM, Chiarle R, Arnstein M, Perin PC, Camussi G, Cooper ME, Gruden G. Heat shock protein expression in diabetic nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol. 2008

Beitz, E Schultz, JE. ("[Aquaporin--a cellular water channel as a therapeutic target?]." Pharm Unserer Zeit 1999; 28: 67-73

Bellini S, Barutta F, Mastrocola R, Imperatore L, Bruno G, Gruden G. Heat Shock Proteins in Vascular Diabetic Complications: Review and Future Perspective. Int J Mol Sci. 2017

Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. N Engl J Med 2002; 346: 557–563

Bertalan G, Boehm-Sturm P, Schreyer S, Morr AS, Steiner B, Tzschätzsch H, Braun J, Guo J, Sack I. The influence of body temperature on tissue stiffness, blood perfusion, and water diffusion in the mouse brain. Acta Biomater. 2019; 96:412–420

Bhattacharjee, H., Rosen, B. P. and Mukhopadhyay, R. Aquaglyceroporins and metalloid transport: implications in human diseases. Handb Exp Pharmacol 2009: 309-325.

Bienert, GP, Moller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Moller IM, Schjoerring JK, Jahn TP. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. J Biol Chem 2007; 282:1183-1192.

Boenisch T Handbuch II der Immunhistochemischen Färbemethoden 4. Auflage. Hamburg: DAKO Diagnostika GmbH, 2000

Borgnia, M, Nielsen, S, Engel, A and Agre, P. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. Annu Rev Biochem 1999; 68: 425-458

Boury-Jamot M, Daraspe J, Bonte F, Perrier E, Schnebert S, Dumas M, Verbavatz, JM. Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis. Handb Exp Pharmacol 2009; (190): 205-217

Brown D. The Discovery of Water Channels (Aquaporins). Ann Nutr Metab. 2017;70 Suppl 1: 37-42

Butler TL, Au CG, Yang B, Egan JR, Tan YM, Hardeman EC, North KN, Verkman AS, Winlaw DS. Cardiac aquaporin expression in humans, rats, and mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006 Aug; 291:H705-713

Byard R, Payne-James J. "Encyclopedia of forensic and legal medicine", 2. Auflage. Amsterdam: Elsevier, 2015

Calloni G, Chen T, Schermann SM, Chang HC, Genevaux P, Agostini F, Tartaglia GG, Hayer-Hartl M, Hartl FU. DnaK Functions as a Central Hub in the E. coli Chaperone Network. Cell Rep 2012; 1: 251-264

Cappello F, Conway de Macario E, Marasà L, Zummo G, Macario AJ. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. Cancer Biol Ther. 2008;7(6):801–809

Carbrey JM, Agre P. Discovery of the aquaporins and development of the field. Handb Exp Pharmacol 2009; (190): 3-28

Chaumont F, Fetter K; Van Wilder V, Moshelion M. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity; The Plant Cell, 2004; (16): 215-228

Chebotareva N, Bobkova I, Shilov E. Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy. Cell Stress Chaperones 2017; 22: 319-343

Cheng A., Van Hoek AN, Yeager M, Verkman AS, Mitra AK. Threedimensional organization of a human water channel. Nature 1997; 387: 627-630

Chepelinsky AB. Structural function of MIP/aquaporin 0 in the eye lens; genetic defects lead to congenital inherited cataracts. Handb Exp Pharmacol 2009; (190): 265-297.

Chiricosta L, Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. Could the Heat Shock Proteins 70 Family Members Exacerbate the Immune Response in Multiple Sclerosis? An in Silico Study. Genes (Basel). 2020 Jun 3;11(6):615

Chrispeels MJ, Agre P. Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells. Trends Biochem Sci 1994; (19): 421-425

Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress Chaperones 2005; 10: 86-103

Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. Experimental Biology and Medicine. 1941

Cuerrier CM, Chen YX, Tremblay D, Rayner K, McNulty M, Zhao X, Kennedy CR, de BelleRoche J, Pelling AE, O'Brien ER. Chronic over-expression of heat shock protein 27

attenuates atherogenesis and enhances plaque remodeling: a combined histological and mechanical assessment of aortic lesions. PLoS One. 2013; 8(2): e55867

de Groot BL, Frigato T, Helms V, Grubmuller H. The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. J Mol Biol 2003; 333: 279-293

Delporte C. Aquaporins in secretory glands and their role in Sjogren's syndrome. Handb Exp Pharmacol 2009; (190): 185-201

Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. J Biol Chem 1988; 263: 15634–15642.

Dettmer A. (2016) Polyzystische Lebererkrankungen. In: Manns M, Schneidewind S, Hrsg. Praxis der Hepatologie. Berlin – Heidelberg: Springer, 2016

Dirnhofer R, Sigrist T. Muskelblutungen im Körperkern -ein Zeichen vitaler Reaktion beim Tod durch Unterkühlung? Beitr Gerichtl Med 1979; 37: 159-166

Doberentz E, Madea B. Hitzeschockproteine als forensisch und klinisch bedeutende Stressmarker. Rechtsmedizin 2019; 29: 219–231

Doss RW, El-Rifaie AA, Abdel-Wahab AM, Gohary YM, Rashed LA. Heat Shock Protein-70 Expression in Vitiligo and its Relation to the Disease Activity. Indian J Dermatol. 2016; 6:408–412

Echevarría M, Muñoz-Cabello AM, Sánchez-Silva R, Toledo-Aral JJ, López-Barneo J. Development of cytosolic hypoxia and hypoxia-inducible factor stabilization are facilitated by aquaporin-1 expression. J Biol Chem 2007; 282: 30207- 30215

Eidahl JML, Stray-Pedersen A, Rognum TO, Opdal SH. Aquaporin 4 expression in the hippocampus in sudden infant death syndrome and sudden unexplained death in childhood. J Chem Neuroanat. 2021 Sep; 115: 101962

Engel A, Fujiyoshi Y, Gonen T, Walz T. Junction-forming aquaporins. Curr Opin Struct Biol 2008; 18: 229-235

Escudero-Hernández C, Münch A, Østvik AE, Granlund AVB, Koch S. The Water Channel Aquaporin 8 is a Critical Regulator of Intestinal Fluid Homeostasis in Collagenous Colitis. J Crohns Colitis. 2020; 14: 962-973

Feng J, Yan S, Chen Y, Han L, Wen L, Guo X, Wen Y, Li Y, He X, Han Z, Ren C, Jia Z, Guo Z, Zhai R, Wu J, Wen J. Aquaporin1-3 expression in normal and hydronephrotic kidneys in the human fetus. Pediatr Res. 2019; 86: 595-602

Fernández-Fernández MR, Valpuesta JM. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. F1000Res 2018; 7: F1000

Fernández-Llama P, Jimenez W, Bosch-Marcé M, Arroyo V, Nielsen S, Knepper MA. Dysregulation of renal aquaporins and Na-Cl cotransporter in CCl4-induced cirrhosis. Kidney Int 2000; 58: 216-228

Fließ B. Aceton als Marker für Unterkühlung- eine retrospektive Untersuchung, Dissertation: Institut der Rechtsmedizin der medizinischen Fakultät Charité- Berlin; 2012

Flohé S, Matthes G, Paffrath T., Trentzsch H, Wölfl C Hrsg. In: Schwerverletztenversorgung. Stuttgart: Thieme Verlagsgruppe, 2018

Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, Grubmüller H, Agre P, Engel A. Structure and function of water channels. Curr Opi Struct Biol 2002; 12: 509-515

Gallardo P, Cid LP, Vio CP, Sepúlveda FV. Aquaporin-2, a regulated water channel, is expressed in apical membranes of rat distal colon epithelium. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001; 281: G856-563

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 2006; 5: 2592-2601

Genneper, L. "Expression von Hitzeschockprotein 27 und 70 in verschiedenen Organsystemen beim humanen Tod nach Brandeinwirkung", Dissertation am rechtsmedizinischen Institut der medizinischen Fakultät der rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; 2016

Gorter E, Grendel F. On bimolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood J Exp Med 1925;41: 439-443

Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck, E, Busch MA. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2013; 56: 650-655

Gressner A, Arndt T. Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Auflage. Berlin –Heidelberg, Springer 2013

Guo Q, Du X, Zhao Y, Zhang D, Yue L, Wang Z. Ischemic postconditioning prevents renal ischemia reperfusion injury through the induction of heat shock proteins in rats. Mol Med Rep. 2014; 10: 2875-2881

Haas IG, Meo T. cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain binding protein. In: Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85: 2250-2254

Hara M, Verkman AS. Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 7360-7365

Hara-Chikuma M, Tanaka M, Verkman AS, Yasui M. Inhibition of aquaporin-3 in macrophages by a monoclonal antibody as potential therapy for liver injury. Nat Commun. 2020; 11: 5666

Hara-Chikuma M, Verkmann AS. Roles of Aquaporin 3 in the epidermis, J Invest Dermatol 2008; 128: 2145-2151

He J, Yang B. Aquaporins in Renal Diseases. Int J Mol Sci 2019; 20: 366

Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler / Petrides, Biochemie und Pathobiochemie. Berlin– Heidelberg: Springer, 2014

Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. AnnuRev Biochem 1993; 62: 349-384

Hernádez-Pando R, Pedraza-Chaverri J, Orozco-Estévez H, Silva-Serna P, Moreno I, Rondán-Zárate A, Elinos M, Correa-Rotter R, Larriva-Sahd J. Histological and subcellular distribution of 65 and 70 kD heat shock proteins in experimental nephrotoxic injury. Exp Toxicol Pathol 1995; 47: 501-508

Herold G. Innere Medizin. Köln: Herold, 2015

Herrera M, Hong NJ, Garvin JL. Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. Hypertension. 2006; 48: 157-164

Herrmann BL, Mann K. Das hypophysäre Koma. Internist 2003; 44, 1253-1259

Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, Richardson A. Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. Mol Cell Biol 1993; 13: 2909-2918

Hirvonen J. Kälte. In: Brinkmann B, Madea B, Hrsg. Handbuch Gerichtliche Medizin, Band I, Berlin: Springer; 2004

Ho JD, Yeh R, Sandstrom A, Chorny I, Harries WE, Robbins RA, Miercke LJ, Stroud RM. Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 A and its mechanism of conductance. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 7437-7442

Hoogewijs D, Vogler M, Zwenger E, Krull S, Zieseniss A. Oxygen-dependent regulation of aquaporin-3 expression. Hypoxia (Auckl) 2016; 4: 91-97

Hoter A, Naim HY. The Functions and Therapeutic Potential of Heat Shock Proteins in Inflammatory Bowel Disease-An Update. Int J Mol Sci. 2019 Oct 26; 20(21):5331.

Hsu S, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex in Peroxidase Techniques J. Histochem Cytochem 1981; 29: 577-581

Hua Y, Ying X, Qian Y, Liu H, Lan Y, Xie A, Zhu X. Physiological and pathological impact of AQP1 knockout in mice. Biosci Rep 2019; 39: SR20182303

Huebert RC, Vasdev MM, Shergill U, Das A, Huang BQ, Charlton MR, LaRusso NF, SHAH VH. Aquaporin-1 facilitates angiogenic invasion in the pathological neovasculature that accompanies cirrhosis. Hepatology 2010; 52: 238–248

Ishibashi, K.New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12. Handb Exp Pharmacol 2009; (190): 251-262

Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Shimada E, Hata S, Yamamoto H, Hashizume Y, Kimura A, Furukawa F, Kondo T. Forensic application of epidermal AQP3 expression to

determination of wound vitality in human compressed neck skin. Int J Legal Med. 2018 Sep;132(5):1375-1380

Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner, J. Small Heat Shock Proteins are molecular chaperones. J Biol Chem 1993; 268: 1517-1520

Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, and Agre P. Molecular Structure of the Water Channel Through Aquaporin Chip. The Hourglass Model. J Biol Chem 1994; 269: 14648-14654

Kaduszkiewicz H, Bochon B, van den Bussche H, Hansmann-Wiest J, van der Leeden C. The medical treatment of homeless people. Dtsch Aerztebl Int 2017; 114: 673-673

Kato K, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Natsume H, Katagiri Y, Hirose Y, Mizutani J, Tokuda H, Otsuka T, Regulation by heat shock protein 27 of osteocalcin synthesis in osteoblasts. Endocrinology 2011; 152, 1872-1882

Khandia R, Munjal AK, Iqbal HMN, Dhama K. Heat Shock Proteins; Therapeutic perspectives in Inflammatory Disorders. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov 2017; 10: 94-014

Kim JY, Yenari MA. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. Anat Cell Biol. 2013; 46:1-7

King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. Nat Rev Mol Cell Biol 2004; 5: 687-698

Klinke R. Pape HC, Silbernagl S. Physiologie. 5. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2005 Koolmann J, Röhm K. Taschenatlas der Biochemie. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2003

Kraemer BF, Mannell H, Lamkemeyer T, Franz-Wachtel M, Lindemann S. Heat-Shock Protein 27 (HSPB1) Is Upregulated and Phosphorylated in Human Platelets during ST-Elevation Myocardial Infarction. Int J Mol Sci 2019; 20: 5968

Krane CM, Goldstein DL. Comparative functional analysis of aquaporins/glyceroporins in mammals and anurans. Mamm Genome 2007; 18: 452-462

Kregel KC. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J Appl Physiol 2002; 92: 2177-2186

Kuebler WM. Acute Respiratory Distress Syndrome: Biomarkers, Mechanisms, and Water Channels. Anesthesiology 2019; 130: 364-366

Kumar S, Stokes J 3rd, Singh UP, Scissum Gunn K, Acharya A, Manne U, Mishra M. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. Cancer Lett 2016; 374:156–166

Kwon TH, Frøkiær J, Nielsen S. Regulation of aquaporin-2 in the kidney: A molecular mechanism of body-water homeostasis. Kidney Res Clin Pract. 2013; 32: 96-102

Kwon, TH, Nielsen J, Moller HB, Fenton RA, Nielsen S, Frokiaer J. Aquaporins in the kidney. Handb Exp Pharmacol 2009; 190: 95-132

Laforenza U, Gastaldi G, Polimeni M, Tritto S, Tosco M, Ventura U, Scaffino MF, Yasui

M. Aquaporin-6 is expressed along the rat gastrointestinal tract and upregulated by feeding in the small intestine. BMC Physiol 2009; 9: 18

Langmuir I. The Constitution and fundamental properties od solids and liquids Part II. Liquids. J Am Chem Soc 1917; 39: 1848-1906

Larsen R. Hypothermie. Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege. 2016; 994-997

Laskey H, Honda BM, Mills AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. Nature, 1978; 275, 416-420

Lei L, Wang W, Jia Y, Su L, Zhou H, Verkman AS, Yang B. Aquaporin-3 deletion in mice results in renal collecting duct abnormalities and worsens ischemia-reperfusion injury. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017; 1863: 1231-1241

Leitlinie AWMF. 2013: Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms Langversion 1.0. https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-053OL.html (Zugriffsdatum: 10.05.2021)

Li D, Shi X, Zhao L, Liang Z, Xie S, Wang G. Overexpression of Aquaporin 1 on cysts of patients with polycystic liver disease. Rev Esp Enferm Dig. 2016; 108: 71-78

Li Z, Song Y, Xing R, Yu H, Zhang Y, Li Z, Gao W. Heat shock protein 70 acts as a potential biomarker for early diagnosis of heart failure. PLoS One 2013;8: e67964

Li Z, Srivastava P. Heat-shock proteins. Curr Protoc Immunol. 2004; Appendix 1: Appendix 1T

Li L, Weng Z, Yao C, Song Y, Ma T. Aquaporin-1 Deficiency Protects Against Myocardial Infarction by Reducing Both Edema and Apoptosis in Mice. Sci Rep. 2015; 5: 13807

Li Y, Wang W, Jiang T, Yang B. Aquaporins in Urinary System. Adv Exp Med Biol. 2017; 969: 131–148

Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet 1988; 22: 631-677

Luo H, Liu Y, Song Y, Hua Y, Zhu X. Aquaporin 1 affects pregnancy outcome and regulates aquaporin 8 and 9 expressions in the placenta. Cell Tissue Res. 2020; 381: 543-

554#

Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkmann AS. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. J Biol Chem 1998; 273: 4296-4299

Macey RI, Farmer RE. Inhibition of Water and Solute Permeability in Human Red Cells. Biochem Biophys Acta 1970; 211, 104-106

Madea, B. Praxis Rechtsmedizin. 2. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin, 2003

Madea B., Preuß J, Liegnitz E. Unterkühlung. Umstände, morphologische Befunde und ihre Pathogenese. Rechtsmedizin 2004; 14: 41-59

Maeda N, Hibuse T, Funahashi T. Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism; involvement in obesity. Handb Exp Pharmacol 2009: 190: 233-249.

Marlar S, Jensen HH, Login FH, Nejsum LN. Aquaporin-3 in Cancer. Int J Mol Sci 2017; 18: 2106

Marrone J, Lehmann GL, Soria LR, Pellegrino JM, Molinas S, Marinelli RA. Adenoviral transfer of human aquaporin-1 gene to rat liver improves bile flow in estrogen-induced cholestasis. Gene Ther 2014 ; 21: 1058-1064

Masyuk AI, LaRusso NF. Aquaporins in the hepatobiliary system. Hepatology. 2006; 43: S75-S81

Matsumoto T, Urushido M, Ide H, Ishihara M, Hamada-Ode K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Taguchi T, Horino T, Fujimoto S, Terada Y. Small Heat Shock Protein Beta-1 (HSPB1) Is Upregulated and Regulates Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Cells in Acute Kidney Injury. PLoS One 2015; 10: e0126229

Mehlen P, Arrigo AP. The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localisation and levels of oligomerisation. Eur. J. Biochem 1994; 221, 327-334

Mengel A. Kältebedingte innere Kniegelenkbefunde beim Unterkühlungstod unter Berücksichtigung anderer kälteassoziierter pathomorphologischer Befunde. Dissertation: Institut für Rechtsmedizin der Universität Greifswald; 2009

Merchant S, Korbelik M. Heat shock protein 70 is acute phase reactant: response elicited by tumor treatment with photodynamic therapy. Cell Stress Chaperones 2011; 16: 153-162

Merkel, J. Hypothermie beim polytraumatisierten Patienten. Entstehung und Einfluss auf das Outcome. Dissertation: Lehrstuhl für Unfallchirurgie der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg; 2014

Miernyk JA. Protein folding in the plant cell. Plant Physiol 1999; 121, 695-703

Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, Gastpar R, Issels RD. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. Int J Hyperthermia 2002; 18: 563–575

Miller RT. Aquaporin in the heart--only for water? J Mol Cell Cardiol 2004; 36: 653-654

Misawa T, Arima K, Mizusawa H, Satoh J. Close association of water channel AQP1 with amyloid-beta deposition in Alzheimer disease brains. Acta Neuropathol 2008; 116: 247-260

Mommsen P, Zeckey C, Frink C, Krettek C, Hildebrand F. Akzidentelle Hypothermie beim Polytrauma Zentralbl Chir 2011; 137: 264-269

Morimoto RI, Milarski KL. Expression and function of vertebrate hsp70 genes. In: Stress Proteins in Biology and Medicine. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990

Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-Chikuma M, Andoo A, Shimono M, Matsuki A, Kobayashi K, Ikeda M, Yamamoto T, Verkman A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K. Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. Mol Cell Biol 2005; 25: 7770-7779

Morrissey JJ, Mellnick VM, Luo J, Siegel MJ, Figenshau RS, Bhayani S, Kharasch ED. Evaluation of Urine Aquaporin-1 and Perilipin-2 Concentrations as Biomarkers to Screen for Renal Cell Carcinoma: A Prospective Cohort Study. JAMA Oncol. 2015; 1: 204-212

Müller,S. Memorix Notfallmedizin. 8. Auflage, Stuttgart. Thieme, 2007

Musiał K, Zwolińska D. Heat shock proteins in chronic kidney disease. Pediatr Nephrol. 2011; 26:1031-1037

Nakamura H, Minegishi H. HSP60 as a drug target. Curr Pharm Des 2013; 19: 441-451

Nalle SC, Barreira da Silva R, Zhang H, Decker M, Chalouni C, Xu M, Posthuma G, de Mazière A, Klumperman J, Baz Morelli A, Fleire SJ, Verkman AS, Trombetta ES, Albert ML, Mellman I. Aquaporin-3 regulates endosome-to-cytosol transfer via lipid peroxidation for cross presentation. PLoS One. 2020; 15: e0238484

Netti VA, Iovane AN, Vatrella MC, Zotta E, Fellet AL, Balaszczuk AM. Effects of nitric oxide system and osmotic stress on Aquaporin-1 in the postnatal heart. Biomed Pharmacother 2016; 81: 225-234

Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. Physiol Rev 2002; 82: 205-244

Nielsen S, Kwon TH, Frokiaer J, Agre P. Regulation and dysregulation of aquaporins in water balance disorders. J Intern Med 2007; 261: 53-64

Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Agre P. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90, 7275-7279

Ohta E, Itoh T, Nemoto T, Kumagai J, Ko SB, Ishibashi K, Ohno M, Uchida K, Ohta A, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Rai T. Pancreas-specific aquaporin 12 null mice showed increased susceptibility to caerulein-induced acute pancreatitis. Am J Physiol Cell Physiol 2009; 297: C1368-1378

O'Neill S, Humphries D, Tse G, Marson LP, Dhaliwal K, Hughes J, Ross JA, Wigmore SJ, Harrison EM. Heat shock protein 90 inhibition abrogates TLR4-mediated NF-κB activity and reduces renal ischemia-reperfusion injury. Sci Rep 2015; 5: 12958

Opdal SH, Vege A, Stray-Pedersen A, Rognum TO. Aquaporin-4 gene variation and sudden infant death syndrome. Pediatr Res. 2010 Jul; 68(1): 48-51.

Paganelli CG, Solomon AK. The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. J gen Physiol 1957; 41: 259-278

Park JH, Saier MH. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. J Membr Biol 1996; 153: 171-180

Patil RV, Saito I, Yang X, Wax MB. Expression of aquaporins in the rat ocular tissue. Exp Eye Res 1997, 64: 203-209

Pons H, Ferrebuz A, Quiroz Y, Romero-Vasquez F, Parra G, Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B. Immune reactivity to heat shock protein 70 expressed in the kidney is cause of salt-sensitive hypertension. Am J Physiol Renal Physiol 2013; 304: F289-299

Posfai D, Sylvester K, Reddy A, Ganley JG, Wirth J, Cullen QE, Dave T, Kato N, Dave SS, Derbyshire ER. Plasmodium parasite exploits host aquaporin-3 during liver stage malaria infection. PLoS Pathog 2018; 14: e1007057

Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88, 11110–11114

Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P: Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science 1992; 256: 385-387

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

Preusse-Prange A, Modrow JH, Schwark T, von Wurmb-Schwark N. Detection of constitutive and inducible HSP70 proteins in formalin fixed human brain tissue. Forensic Sci Int. 2014 Feb; 235:62-7.

Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? Cell Stress Chaperones 2016; 21: 379-404

Rahim RA, Boyd PA, Ainslie Patrick WJ, Burdon RH. Human heat shock protein gene polymorphisms and sudden infant death syndrome. Arch Dis Child 1996; 75: 451-452

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. Vet Pathol. 2005 Jul;42(4):405-26. doi: 10.1354/vp.42-4-405. PMID: 16006601.

Ran X, Wang H, Chen Y, Zeng Z, Zhou Q, Zheng R, Sun J, Wang B, Lv X, Liang Y, Zhang K, Liu W. Aquaporin-1 expression and angiogenesis in rabbit chronic myocardial ischemia is decreased by acetazolamide. Heart Vessels 2010; 25: 237-247

Ranek MJ, Stachowski MJ, Kirk JA, Willis MS. The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2018; 373: 20160530

Reizer J, Reizer A, Saier MH. The MIP family of integral membrane channel proteins – sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution

and proposed functional-differentiation of the 2 repeated halves of the proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol 1993; 28: 235-257

Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Experientia 1962; 18: 571-573

Rizk FH, Sarhan NI, Soliman NA, Ibrahim MAA, Abd-Elsalam M, Abd-Elsalam S. Heat shock protein 47 as indispensible participant in liver fibrosis: Possible protective effect of lactoferrin. IUBMB Life 2018; 70: 795-805

Rodríguez-Iturbe B, Johnson RJ. Heat shock proteins and cardiovascular disease. Physiol Int 2018; 105: 19-37

Rojek A, Praetorius J, Frokiaer J, Nielsen S, Fenton RA. A Current View of the Mammalian Aquaglyceroporins. Annu Rev Physiol 2008; 70: 301-327

Rump K, Adamzik M. Function of aquaporins in sepsis: a systematic review. Cell Biosci 2018; 8:10

Rutkovskiy A, Bliksøen M, Hillestad V, Amin M, Czibik G, Valen G, Vaage J, Amiry-Moghaddam M, Stensløkken KO. Aquaporin-1 in cardiac endothelial cells is downregulated in ischemia, hypoxia and cardioplegia. J Mol Cell Cardiol 2013a; 56: 22-33

Rutkovskiy A., Mariero L, Nygard S. Transient hyperosmolality modulates expression of cardiac aquaporins. Biochem Biophys res Commun 2012a; 425: 70-75

Rutkovskiy A, Stensløkken KO, Mariero LH, Skrbic B, Amiry-Moghaddam M, Hillestad V, Valen G, Perreault MC, Ottersen OP, Gullestad L, Dahl CP, Vaage J. Aquaporin-4 in the heart: expression, regulation and functional role in ischemia. Basic Res Cardiol 2012b; 107: 280

Rutkovskiy A, Valen G, Vaage J. Cardiac aquaporins. Basic Res Cardiol 2013b; 108: 393

Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. Nat Rev Mol Cell Biol 2013; 14: 630–642

Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Sanchez-Lopez E, Ruiz-Ortega M, Benito-Martin A, Saleem MA, Mathieson PW, Mezzano S, Egido J, Ortiz A. HSP27/HSPB1 as an adaptive podocyte antiapoptotic protein activated by high glucose and angiotensin II. Lab Invest 2012; 92: 32-45

Schmidt RF, Lang F., Hrsg. Physiologie des Menschen. Berlin – Heidelberg; Springer, 2007

Seekamp, A. Hypothermie. Notfallmedizin up2date 2008; 3: 1-2

Shimasaki M, Kanazawa Y, Sato K, Tsuchiya H, Ueda Y. Aquaporin-1 and -5 are involved in the invasion and proliferation of soft tissue sarcomas. Pathol Res Pract 2018; 214: 80-88

Sohara E, Uchida S, Sasaki S. Function of aquaporin-7 in the kidney and the male reproductive system. Handb Exp Pharmacol 2009; 190: 219-231

Song Y, Jayaraman S, Yang B, Matthay MA, Verkman AS. Role of aquaporin water channels in airway fluid transport, humidification, and surface liquid hydration. J Gen Physiol 2001; 117: 573-582

Sonna LA, Kuhlmeier MM, Khatri P, Chen D, Lilly CM. A microarray analysis of the effects of moderate hypothermia and rewarming on gene expression by human hepatocytes (HepG2). Cell Stress Chaperones 2010; 15: 687-702

Sonntag Y, Gena P, Maggio A, Singh T, Artner I, Oklinski MK, Johanson U, Kjellbom P, Nieland JD, Nielsen S, Calamita G, Rützler M. Identification and characterization of potent and selective aquaporin-3 and aquaporin-7 inhibitors. J Biol Chem. 2019; 294: 7377-7387

Sookoian S, Castaño GO, Scian R, San Martino J, Pirola CJ. Heat Shock Protein 27 is down-regulated in Ballooned Hepatocytes of Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). Sci Rep 2016; 6: 22528

Sreedharan S, Petros JA, Master VA, Ogan K, Pattaras JG, Roberts DL, Lian F, Arnold RS. Aquaporin-1 protein levels elevated in fresh urine of renal cell carcinoma patients:

potential use for screening and classification of incidental renal lesions. Dis Markers 2014; 2014: 135649

Statistisches Bundesamt, Sterbefälle insgesamt nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10, 2020. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html

Su W, Cao R, Zhang XY, Guan Y. Aquaporins in the kidney: physiology and pathophysiology. Am J Physiol Renal Physiol 2020; 318: F193-F203

Takeda T, Taguchi D. Aquaporins as potential drug targets for Meniere's disease and its related diseases. Handb Exp Pharmacol 2009; (190): 171-184.

Ternes W. Biochemie der Elemente: Anorganische Chemie biochemischer Prozesse. Berlin – Heidelberg: Springer, 2013

Thews G, Vaupel P. Vegetative Physiologie, 5. Auflage. Berlin: Springer, 2005

Tie L, Wang D, Shi Y, Li X. Aquaporins in Cardiovascular System. Adv Exp Med Biol 2017; 969: 105-113

Tomita Y, Dorward H, Yool AJ, Smith E, Townsend AR, Price TJ, Hardingham JE. Role of Aquaporin 1 Signalling in Cancer Development and Progression. Int J Mol Sci 2017; 18: 299

Toth ME, Gonda S, Vigh L, Santha M. Neuroprotective effect of small heat shock protein, Hsp27, after acute and chronic alcohol administration. Cell Stress Chaperones 2010; 15: 807-817

Toussaint J, Raval CB, Nguyen T, Fadaifard H, Joshi S, Wolberg G, Quarfordt S, Jan KM, Rumschitzki DS. Chronic hypertension increases aortic endothelial hydraulic conductivity by upregulating endothelial aquaporin-1 expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2017; 313: H1063-H1073

Tran TL, Bek T, Holm L, la Cour M, Nielsen S, Prause JU, Rojek A, Hamann S, Heegaard

S. Aquaporins 6-12 in the human eye. Acta Ophthalmol 2013; 91: 557-563

Tsagalis GC, Nikolopoulou N, Sotsiou F, Hadjiconstantinou V. The expression of heat shock proteins 27 and 70 in lupus nephritis. Hospital Chronicles 2006; 1: 125–129

van Aken HK, Reinhart K, Weigand M, Welte T. Intensivmedizin. 3. Auflage. Stuttgart:

Thieme, 2014

van Os CH, Deen PM. Aquaporin-2 water channel mutations causing nephrogenic diabetes insipidus. Proc Assoc Am Physicians 1998; 110: 395-400

Venkataseshan VS, Marquet E. Heat shock protein 72/73 in normal and diseased kidneys. Nephron 1996; 73: 442-449

Verkerk AO, Lodder EM, Wilders R. Aquaporin Channels in the Heart-Physiology and Pathophysiology. Int J Mol Sci 2019; 20: 2039

Verkman AS. Aquaporin water channels and endothelial cell function. J Anat 2002; 200: 617-627

Verkman AS. Aquaporins: translating bench research to human disease. J Exp Biol 2009a; 212: 1707-1715

Verkman AS. Knock-out models reveal new aquaporin functions. Handb Exp Pharmacol 2009b; (190): 359-381

Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine. Annu Rev Med 2012; 63, 303–316

Verkman AS, Hara-Chikuma M, Papadopoulos MC. Aquaporins-new players in cancer biology. J Mol Med 2008; 86: 523-529

Vidyasagar A, Reese SR, Hafez O, Huang LJ, Swain WF, Jacobson LM, Torrealba JR, Chammas PE, Wilson NA, Djamali A. Tubular expression of heat-shock protein 27 inhibits fibrogenesis in obstructive nephropathy. Kidney Int 2013; 83: 84-92

Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. Fibrogenesis Tissue Repair 2012; 5: 7

Walz T, Hirai T, Murata K, Heymann JB, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Smith BL, Agre P, Engel

A. The three-dimensional structure of aquaporin-1. Nature 1997; 387, 624–627

Wang W, Geng X, Lei L, Jia Y, Li Y, Zhou H, Verkman AS, Yang B. Aquaporin-3 deficiency slows cyst enlargement in experimental mouse models of autosomal dominant polycystic kidney disease. FASEB J. 2019; 33: 6185-6196

Wang Y, Wu G, Fu X, Xu S, Wang T, Zhang Q, Yang Y. Aquaporin 3 maintains the stemness of CD133+ hepatocellular carcinoma cells by activating STAT3. Cell Death Dis 2019 ; 10: 465

Wang C, Zhang Y, Guo K, Wang N, Jin H, Liu Y, Qin W. Heat shock proteins in hepatocellular carcinoma: Molecular mechanism and therapeutic potential. Int J Cancer 2016; 138:1824-1834

Weis S, Dickmann P, Pletz MW, Coldewey SM, Gerlach H, Bauer M. Sepsis 2017: eine neue Definition führt zu neuen Konzepten. Dtsch Arztebl 2017; 114: A-1424 / B-1196

Wilhelm W. Hrsg. Praxis der Intensivmedizin. Berlin – Heidelberg: Springer, 2013

Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. Lancet Neurol 2007; 6: 805-815

Wu B, Beitz E. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. Cell Mol Life Sci 2007; 64: 2413-2421

Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. Trends Pharmacol Sci 2017; 38: 226-256

Wu W, Lu Z, Li Y, Chen Z, Jiang H, Li Y. Decreased Cardiac Expression of Heat Shock Protein 27 is Associated with Atrial Fibrillation in Patients with Rheumatic Heart Disease. Acta Cardiol Sin 2015; 31: 1-7

Xu Y, Yao H, Wang Q, Xu W, Liu K, Zhang J, Zhao H, Hou G. Aquaporin-3 Attenuates Oxidative Stress-Induced Nucleus Pulposus Cell Apoptosis Through Regulating the P38 MAPK Pathway. Cell Physiol Biochem 2018; 50: 1687–1697

Yasui M. pH regulated anion permeability of aquaporin-6. Handb Exp Pharmacol 2009; (190): 299-308

Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB, Agre P. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. Nature 1999; 402:184-187

Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Kaneko F, Hibi T. Aquaporin-1 associated with hepatic arterial capillary proliferation on hepatic sinusoid in human cirrhotic liver. Liver Int 2011; 31: 1554-1564

Yun CW, Kim HJ, Lim JH, Lee SH. Heat Shock Proteins. Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. Cells. 2019; ;9(1):60

Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. Handb Exp Pharmacol 2009; (190): 159-170

Zhang YW, Bi LT, Hou SP, Zhao XL, Song YL, Ma TH. Reduced lung water transport rate associated with downregulation of aquaporin-1 and aquaporin-5 in aged mice. Clin Exp Pharmacol Physiol 2009; 36: 734-738

Zhang J, Fan N, Peng Y. Heat shock protein 70 promotes lipogenesis in HepG2 cells. Lipids Health Dis 2018; 17: 73

Zhang C, Lyu Z, Wang Y, Zhang C. Mild hypothermia regulates aquaporin 4 expression in brain tissue of rats with cardiopulmonary resuscitation and reduces brain edema through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue 2019; 31: 480-483

Zhang D, Vetrivel L, Verkman AS. Aquaporin deletion in mice reduces intraocular pressure and aqueous fluid production. J Gen Physiol 2002; 119: 561-569

Zheng Y, Miao X. [Expression and significance of aquaporin-9 in the liver]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2014; 39: 868-873

Zhu Y, Wang Y, Teng W, Shan Y, Yi S, Zhu S, Li Y. Role of Aquaporin-3 in Intestinal Injury Induced by Sepsis. Biol Pharm Bull 2019; 42: 1641-1650

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im rechtsmedizinischen Institut der rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Betreuung von Prof. Burkhard Madea durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Prof. Burkhard Madea.

Sämtliche Versuche/Analysen wurden (nach Einarbeitung durch

Herrn Dirk Böker eigenständig durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde in Zusammenarbeit

mit Fr. Dr. Rebecca Wagner und Herrn Julian Geile.zusammengestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Herrn. Dr. Daniel Grigutsch durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

11 Danksagung

Mein besonderer Dank für die stets gute Betreuung und die produktive Zusammenarbeit gilt dem Direktor des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn, Herrn Prof. Dr. med. B. Madea, Frau Dr. Rebecca Wagner, Herrn Dr. Philipp Markwerth und Herrn Julian Geile für die gute Betreuung und stets hilfreiche Beratung, mit der sie mich bei der Erarbeitung der Dissertation unterstützt haben.

Herrn Dirk Böker, für die stets freundliche und geduldige Unterstützung bei der Einarbeitung und Durchführung der praktischen Arbeit in der Immunhistochemie.

Herrn Christian Mohr für die große Hilfe bei allen technischen Fragen. Außerdem danke ich den Präparatorinnen des Instituts.

Frau Vesna Bosnic-Wehner, Herrn Michael Hengstermann und Herrn Dr. Daniel Grigutsch für hilfreiche Beratung und konstruktive Vorschläge bei allen technischen Fragen außerhalb des Instituts.

Frau Lena Stelgens und Frau Samantha Sommer, ohne die diese Dissertation niemals fertig geworden wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Karin und Bernd-Dieter Hengstermann, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet und stets motiviert haben. Außerdem meinem Lebensgefährten, Herrn Benjamin El-Mustafa, für seine Unterstützung und sein Verständnis bei der Anfertigung dieser Dissertation.