

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat den Nachweis von Zytokeratinen in der differenzierten aviären Epidermis durch monoklonale Antikörper zum Ziel. Mit Hilfe der B-SA-Methode wurde zunächst die Reaktivität von 12 monoklonalen Antikörpern in Hühnerhaut geprüft, um dann mit Hilfe positiv reagierender Antikörper das epidermale Verteilungsmuster von Zytokeratinen in definierten Altersgruppen und verschiedenen Hautregionen in größerem Umfang zu analysieren. Es wurden zu diesem Zweck Proben aus sechs Hautgebieten von 24 Legehühnern und 24 Masthühnern von jeweils sechs Altersstufen untersucht. Damit fand gleichzeitig ein Vergleich der beiden Nutzungsrichtungen in die Untersuchungen Eingang.

Im Ergebnis der immunhistochemischen Voruntersuchungen reagierten nur vier von zwölf monoklonalen Zytokeratinmarkern in der Hühnerhaut positiv. Hierbei handelt es sich um die Antikörper AE 1 (CK 10, 14, 16, 19), AE 3 (CK 1, 5, 8), LP 34 (CK 6, 18) und LL 002 (CK 14), deren Reaktionen mit Zytokeratin-Antigen ausschließlich in der geschichteten Epidermis bzw. in der Epidermis der Federfollikel lokalisiert waren. Damit belegen die positiven Ergebnisse der Antikörper AE 1, AE 3 sowie LP34 und LL002 spezifische Kreuzreaktionen zwischen den epidermalen Zytokeratinen des Menschen und der Hühner und rechtfertigen so eine grundsätzliche Anwendung von monoklonalen Antikörpern, die gegen Zytokeratine des Menschen gerichtet sind auch in der aviären Epidermis. Die eigenen Untersuchungsergebnisse unterstreichen dabei besonders die Verwendbarkeit der Zytokeratinmarker in der adulten Epidermis, denn während Kreuzreaktionen in epidermalen Vorläufergeweben des Hühnerembryos schon häufiger belegt werden konnten (SCHMID et al., 1979; ERICKSON et al., 1987; PAGE, 1989), gab es bisher nur vereinzelt Studien wie die von ARIAS et al. (1991), die einen erfolgreichen Einsatz von Zytokeratinmarkern aus dem Humanbereich in adulter aviärer Epidermis dokumentierten. Insbesondere die positiven Ergebnisse nach der kombinierten Anwendung von AE1/AE3 in den Untersuchungen von ARIAS et al. (1991) stimmen mit den eigenen Beobachtungen überein, wobei allerdings im Unterschied zu ARIAS et al. (1990) in den eigenen Untersuchungen diese beide Antikörper einzeln verwendet und bewertet wurden. Darüber hinaus liegen keine Arbeiten vor, die auch Reaktionen von LP34 und LL002 in aviärer Epidermis dokumentieren.

Über die spärliche Anzahl monoklonaler Antikörperstudien in der Haut des Huhnes hinaus zeigt ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit vorliegenden Resultaten in der Haut anderer Vertebraten Gemeinsamkeiten und Unterschiede im generellen Markierungsvermögen der verwendeten Zytokeratinmarker. Beispielhaft seien im Folgenden Mensch und Hund ausgeführt. Wie in den eigenen Untersuchungen visualisieren auch bei Mensch und Hund die Antikörper AE 1 und AE 3 (SUN et al., 1983; WOODCOCK-MITCHELL et al., 1982) sowie LP 34 (KOZAKI et al., 2001; WALTER, 2001) und LL002 (LANE und ALEXANDER, 1990; PURKIS et al., 1990) verschiedene Zytokeratine in der Epidermis. Im Gegensatz zum Huhn erzielen bei diesen beiden Vertretern der Säuger allerdings noch drei weitere Antikörper positive Reaktionen. Demnach markieren KL 1, DE-K 10 und CAM 5.2 beim Menschen (IVANYI et al., 1989; VIAC et al., 1983) wie auch beim Hund (CARDONA et al., 1989; KOZAKI et al., 2001; WALTER, 1998;) epidermale Strukturen, während sie in der Haut des Huhnes nicht anfärben. Gründe dafür sind einmal in der unterschiedlichen Anatomie der Vertebratenhaut zu suchen. Weil die aviäre Haut keine Schweißdrüsen besitzt und auch Talgdrüsen nur in wenigen Regionen, die in der vorliegenden Arbeit nicht bearbeitet wurden, konzentriert sind (VOLLMERHAUS und SINOWATZ, 1992; KÖNIG et al., 2001), ist das negative Ergebnis des Antikörpers CAM 5.2, der in der Haut allein die Drüsenepithelien markiert, nicht überraschend. Bemerkenswerter dagegen erscheinen die beim Huhn negativen Färbeergebnisse von KL 1 und DE-K 10. Die breite Zytokeratinspezifität von KL 1 (CK 1, 2, 5-8, 11, 14, 16-18) bzw. die plattenepitheltypische Zytokeratinspezifität von DE-K 10 (CK 10) ließen eine epidermale Reaktion auch in der Hühnerhaut erwarten.

Somit kann beim Huhn im Vergleich zum Säuger aufgrund der teilweise negativen Färbeergebnisse in der Epidermis insgesamt eine reduzierte Markeraktivität der verwendeten monoklonalen Antikörper festgestellt werden, die unterschiedliche Ursachen haben kann. Zum einen könnten verschiedenen Antikörpern wie KL 1 und DE-K 10 eine fehlende Kreuzreaktivität beim Huhn zugrunde liegen, obwohl tatsächlich entsprechende Zytokeratine in der aviären Epidermis vorhanden sind. In der Literatur heben O'GUIN et al. (1987) ausdrücklich hervor, dass die Zytokeratine des Menschen und verschiedener Tiere, insbesondere auch des Huhnes, trotz funktioneller Übereinstimmung größere strukturelle Unterschiede besitzen. Einen Ausdruck dafür fanden die Autoren in den abweichenden Molekulargewichten der

entsprechenden Zytokeratine. In diesem Zusammenhang können auch weitere Unterschiede auf molekularer Ebene vermutet werden, wobei dann letztlich verschiedenartige Epitope bei den aviären Zytokeratinen eine Ursache für die fehlende Antigen-Antikörperbindung sind. Zur Untermauerung der Annahme, dass allein die Kreuzreaktionen, nicht aber entsprechende Zytokeratine in Hühnerepidermis fehlen, müssten allerdings erst noch andere Methoden wie die SDS-PAGE zum Nachweis spezifischer Zytokeratine herangezogen werden und so die immunhistochemischen Untersuchungen ergänzen.

Weitere Gründe für eine Abschwächung der antigenen Eigenschaften vorhandener Zytokeratine sind in der Vorbereitung und im Verlauf der immunhistochemischen Methodik zu suchen. Als ein möglicher Störfaktor wurde bereits von SUTER et al. (1984) und DESNOYERS (1989) der Einfluss der Fixationsdauer auf die Antigenität bewertet, da mit zunehmender Fixationszeit die Immunreaktivitäten von Zytokeratinantikörpern deutlich abnahmen. Um eine weitgehend optimale Fixation aller Hühnerhautregionen (dünne befiederte und dicke unbefiederte) zu gewährleisten, aber auch Standardbedingungen Rechnung zu tragen, erwies sich in den eigenen Untersuchungen für alle Proben die verwendete Fixation nach LILLIE (1954) mit neutral gepuffertem Formalin über 24h als weitgehend schonend und effektiv.

Im Vergleich der Vorbehandlungen, die der Demaskierung der Antigenepitope durch Erhitzen (SHI et al., 1991; CATTORETTI et al., 1993) oder proteolytische Andauung (MEPHAM et al., 1979) dienen, erwies sich für die aviären Gewebeproben die Proteaseanwendung schonender als die Mikrowellenbehandlung, bei der Citratpuffer zur Antigenverstärkung verwendet wurde. Insbesondere die Paraffinschnitte der dünnen, befiederten Hühnerhaut waren gegenüber der Einwirkung hoher Temperaturen in der Mikrowelle sehr empfindlich und wurden häufig zerstört. Auch hafteten die Schnitte nicht mehr optimal am Objekträger und schwammen zum Teil ab. Selbst bei äußerlich intakten Schnitten blieb die Gefahr der Proteindenaturierung durch Hitze bestehen. Trotzdem konnte auch in den eigenen Untersuchungen das Verfahren der proteolytischen Andauung die Mikrowellenbehandlung nicht ersetzen, da die Anwendung von Protease zwar die Gewebestruktur weitgehend erhielt, aber offenbar nicht bei jedem verwendeten Antikörper geeignet war, einzelne Epitope zu

demaskieren. Somit erwies sich bei AE 3 und LL 002 die Mikrowellenbehandlung als leistungsstarke Alternative, nachdem die Proteaseanwendung nur zu negativen Ergebnissen geführt hatte.

Die Qualität der Färbungen betreffend wiesen am Ende die mit Protease vorbehandelten Hautproben ein insgesamt besseres Resultat als die der Mikrowelle ausgesetzten Proben auf. Die mit Protease behandelten und anschließend mit den Antikörpern AE 1 und LP 34 inkubierten Paraffinschnitte waren gleichermaßen regelmäßig und intensiv in der Färbung. Diejenigen Hautpräparate, die aufgrund der nachfolgenden Anwendung der Antikörper AE 3 und LL 002 der Mikrowellenvorbehandlung unterzogen werden mussten, zeigten dagegen insgesamt schwächere Färbeergebnisse, die zudem noch vermehrt unregelmäßig angefärbt waren.

Als immunhistochemische Methode, mittels derer die verschiedenen monoklonalen Antikörper zum Einsatz gelangten, wurde die B-SA-Methode verwendet. Sie zeichnet sich durch eine höhere Sensivität, das Fehlen unspezifischer Hintergrundfärbung und durch relativ kurze Inkubationszeiten gegenüber anderen direkten und indirekten Methoden der Immunhistochemie aus (BOENISCH, 1997; BOURNE, 1997), was sie auch für die Anwendung an dünner Hühnerhaut geeignet erscheinen ließ.

Im Rahmen der methodischen Arbeiten wurde das Färbeprotokoll letztlich in Teilen modifiziert. Statt in der „feuchten“ Kammer fand die immunhistochemische Bearbeitung der Hautproben bereits in den Voruntersuchungen im „Immunfärbecenter Sequenza™“ (Firma Shandon) statt. Trotz der Gefahr unregelmäßiger Anfärbungen durch ungleichmäßigen Antigen-Antikörperkontakt im kapillären Spalt, der durch das Auflegen der Objektträger auf die Cover-Plates® erzeugt wird (WALTER, 1994), erwies sich die Färbestation als eine komfortable Möglichkeit zur schnellen Diagnostik auch aviärer Hautschnitte, insbesondere in Hinblick auf die Untersuchung großer Probenmengen in den Hauptversuchen. Allerdings machte der hohe Anteil insuffizienter Färbungen am Beginn der Voruntersuchungen weitere Modifikationen im immunhistochemischen Färbeprotokoll notwendig. Zur Gewährleistung einer zuverlässigen Anfärbung und einer gleichzeitigen Steigerung der Qualität war es erforderlich, eine möglichst

optimale Konstellation der verschiedenen Reagenzien und der unterschiedlichen Einflüsse wie Verdünnungen, Inkubationszeiten und Temperatur auszutesten.

So erwiesen sich im Einzelnen die Verwendung von Tris-Pufferlösung (TBS) als Waschlösung und von Hämalaun als Farblösung besser geeignet zu einer optimierten Anfärbung der aviären Epidermis beizutragen als alternative Reagenzien. Speziell beim Antikörper AE 3 musste außerdem eine Verlängerung der Inkubationszeit des Primärantikörpers von 30 auf 60 Minuten bei Raumtemperatur vorgenommen werden, um eine Verbesserung der Färbeintensität ohne störende Hintergrundfärbung zu erreichen.

In der Hauptuntersuchung erfolgte die immunhistochemische Aufbereitung aller Hautschnitte nach einem gleichen, in den Vorversuchen erarbeiteten Standard. Mit Hauptaugenmerk auf die positiv reagierenden monoklonalen Antikörper AE 1, AE 3, LP 34 und LL 002 stand nun die eingehendere Bewertung der Färbung in den Schichten der Epidermis und im Federfollikel hinsichtlich Lokalisation, Intensität und Regelmäßigkeit im Vordergrund, die zur Feststellung eines epidermalen Zytokeratinmusters beim Huhn führen sollte.

Der Breitspektrum-Antikörper **AE 1**, spezifisch für einige Zytokeratine vom Typ I, markierte die geschichtete Epidermis sowohl basal als auch suprabasal, wobei sich beide Schichten verschieden in den Farbqualitäten zeigten. Das Stratum basale wies, unabhängig von Alter und Region, in beiden Nutzungsrichtungen eine regelmäßige und überwiegend kräftige, leuchtend rote Farbe auf. Demgegenüber reagierten die suprabasalen Schichten der Epidermis hinsichtlich Regelmäßigkeit und Intensität der Färbung unterschiedlich, mit deutlicher Abhängigkeit vom Alter. Während in ovo (18. ET) und kurz nach dem Schlupf (1. LT) in beiden Nutzungsrichtungen das Stratum suprabasale durch eine regelmäßige, aber überwiegend schwächere Färbung als im Stratum basale geprägt war, stellten sich die suprabasalen Färbeergebnisse in allen höheren Lebensaltern, und dabei am deutlichsten in der Legerichtung, insgesamt kräftiger gefärbt dar. Besonders auffällig waren in beiden Nutzungsrichtungen ab der 5. Lebenswoche jedoch die deutlichen Unterschiede in der Farbintensität, die für ein uneinheitliches Erscheinungsbild in der suprabasalen Schicht sorgten. Der Anteil der kräftigen Färbung im Stratum suprabasale schien dabei mit dem Lebensalter zuzunehmen, so dass vor allem in

der 22. Lebenswoche die basale und suprabasale Epidemisschicht durch eine einheitliche Anfärbung geprägt war

Die dennoch vorherrschende Heterogenität bei der Farbintensität in den einzelnen Alterstufen lässt einerseits vermuten, dass die überwiegend kräftigere Farbintensität ab der 5. Lebenswoche vornehmlich als Ausdruck einer unspezifischen Antigenexpression in den epidermalen Zellen zu werten ist. Dabei könnte sich in erster Linie die Gewebeaufbereitung (Fixation, Vorbehandlungen) im Hautmaterial der verschiedenen Alterstufen aufgrund abweichender Empfindlichkeiten unterschiedlich ausgewirkt haben. Andererseits kann aber das markante Bild der Zweiteilung des Stratum suprabasale hinsichtlich der Farbintensität die Annahme bekräftigen, dass ab der 5. Lebenswoche eine Aktivitätszunahme von AE 1 vorliegt, die spezifisch an eine Expressierung einzelner Zytokeratine gebunden sein könnte. Von einem altersabhängigen und damit gerichteten dynamischen Prozess kann vor allem die Tatsache zeugen, dass mit dem Älterwerden der Tiere die kräftigere Farbintensität im Stratum suprabasale einen immer breiteren Raum einnimmt und im höherem Lebensalter (vor allem in der 22. LW) die suprabasale Epidermisschicht schließlich vollständig ausfüllt.

Insgesamt bleibt ungeachtet der Schwankungen in der Farbintensität und ungeachtet der altersabhängigen Aktivitätszunahmen im Stratum suprabasale festzuhalten, dass mit AE 1 in der basalen und suprabasalen Epidermis eine permanente Farbreaktion nachgewiesen werden konnte, die sich unabhängig vom Alter, den Regionen und den Nutzungsrichtungen einstellte. Allein damit unterscheidet sich das epidermale Markierungsverhalten beim Huhn sowohl von dem des Menschen, wo AE 1 zunächst grundlegend nur basal reagiert (WOODCOCK-MITCHELL et al., 1982) und erst unter Belastungen ausschließlich suprabasal färbt, als auch von dem des Hundes, wo AE1 allein die suprabasalen Schichten der Epidermis markiert (WALTER, 1998; KOZAKI et al., 2001).

WALTER (1998) vermutet in der suprabasalen Markierungsreaktion von AE 1 in der Epidermis des Hundes einen Ausdruck des Erreichens der gleichen Festigkeit gegenüber der dreifach dickeren menschlichen Epidermis der vergleichbaren Regionen. Entsprechend könnte auch im nur drei bis fünf Zelllagen (je nach Hautregion) umfassenden epidermalen Stratum germinativum der Hühner (LUCAS und STETTENHEIM, 1972) allein die suprabasale Reaktivität von AE 1 als Merkmal einer vergleichbar hohen Stabilität wie bei der menschlichen Epidermis gewertet

werden und ebenso an die konstante Exprimierung stabilisierender Zytokeratine gebunden sein (WEISS et al., 1984; STOLER et al., 1988). Speziell in den befiederten Gebieten könnte die Aktivität von AE 1 im Stratum basale und im Stratum suprabasale darauf verweisen, dass die aviäre Epidermis auf höhere mechanische Belastungssituationen wie sie beispielsweise im Zusammenhang mit einer Flugaktivität auftreten, bei der große Zugkräfte auf die gesamte Haut des Körpers einwirken (LUCAS und STETTENHEIM, 1972), potentiell eingestellt ist, auch wenn das Fliegen für domestizierte Hühnervögel nicht charakteristisch ist.

Zudem waren die altersabhängigen Zunahmen der suprabasalen Aktivität und damit markante Wechsel der Farbintensität innerhalb des Stratum suprabasale besonders deutlich in den am stärksten belasteten Regionen des Tarsometatarsus und des Sohlenballens zu beobachten. Auch in der dickeren Epidermis des Menschen zeigt sich AE 1 in stärker belasteten Regionen wie den Fußsohlen oder bei hyperproliferativen Prozessen suprabasal zunehmend aktiv (WATANABE et al., 1991). Gleichzeitig ist beim Menschen aber ein Verlust der basalen Aktivität von AE 1 zu beobachten, während sie in der eigenen Untersuchung für das Huhn erhalten bleibt. Die stets kräftige basale Aktivität von AE1 scheint allerdings wenig verwunderlich, wenn man bedenkt, dass bei nur zwei bis vier suprabasalen Zellagen das überwiegend einlagige aviäre Stratum basale die Grundfestigkeit der gesamten Epidermis noch wesentlich unterstützen kann, indem es spezifische Zytokeratine exprimiert.

Dagegen waren die Färbeargebnisse von AE 1 im Stratum corneum insgesamt eher schwach und nur in den dicken Hornanteilen der unbefiederten Gebiete sichtbar, während die weniger verhornten unbefiederten Regionen keine Anfärbung der Hornschicht aufwiesen. In wieweit diese Anfärbung spezifisch für ein Zytokeratinvorkommen beim Huhn ist, bleibt hier nur zu vermuten, allerdings wird die Anfärbung des Stratum corneum von anderen Autoren eher unspezifisch eingeschätzt (SCHMIDT et al., 1979) und daher auch hier kritisch bewertet.

Die innere Scheide der Federfollikel war nach AE 1-Anwendung durch eine kräftige und regelmäßig Anfärbung gekennzeichnet. Die starke Intensität der Färbung, die sich unabhängig vom Alter zeigte, könnten in dieser Struktur zum einen dadurch bedingt sein, dass die Federfollikel tiefer in der Haut liegen und damit der Verlust der antigenen Eigenschaften nach 24-stündiger Formalinfixation nicht so groß ist wie bei der interfollikulären Epidermis. Zum anderen kann aber auch das Vorkommen AE 1-

spezifischer Zytokeratine, darunter solche, denen stabilisierende Eigenschaften zugeschrieben werden, ein Merkmal dieser Struktur sein, insbesondere da Federfollikel, wie beispielsweise auch die Schuppenregionen, als Zonen hoher mechanischer Beanspruchung eine hohe Festigkeit besitzen müssen.

Der Breitspektrum-Antikörper **AE 3**, der mit verschiedenen Zytokeratinen vom Typ II reagiert, markierte alle Schichten der Epidermis des Huhnes. Eine zumeist schwache Farbintensität war im Stratum basale, Stratum suprabasale und Stratum corneum ebenso vorherrschend wie in der inneren Scheide der Federfollikel. Dabei reagierte der Antikörper im Stratum basale der interfollikulären Epidermis regelmäßig, während im Stratum suprabasale und im Stratum corneum gelegentlich einzelne ungefärbte Zellverbände beobachtet werden konnten. Auch die inneren Scheiden der Federfollikel wiesen diese Unregelmäßigkeiten auf. Zwar konnte in den eigenen Untersuchungen eine Häufung der unregelmäßigen Ergebnisse in der Altersgruppe des 18. Embryonaltages sowie in den unbefiederten Schuppengebieten des Pulvinus metatarsalis und des Tarsometatarsus beobachtet werden, jedoch wurde dabei jeweils nur eine kleine Probenmenge erfasst, die zu unspezifisch ist, um die Ursache in einer veränderten Zytokeratinexpression in den verschiedenen Alterstufen oder Regionen zu vermuten. Stattdessen kann für die teilweise ungefärbten Zellhaufen eines Schnittes eher eine fehlende Antigenität angenommen werden, da bei allen Färbeversuchen einer Schnittserie jeweils immer dieselben Zellverbände ungefärbt blieben und so deren Verlust vornehmlich im methodischen Bereich gesucht werden sollte. Modifizierende Einflüsse der vorausgegangenen Fixation und Vorbehandlung auf die antigene Reaktionsfähigkeit und die vermutlich eher unspezifische Anfärbung des Stratum corneum wurden bereits ausführlich in diesem Kapitel diskutiert. Folglich ergibt das gesamte Markierungsverhalten von AE 3 keine deutlichen Hinweise auf eine Abhängigkeit von Alter und Hautregion und auch bei der vergleichenden Betrachtung der beiden Nutzungsrichtungen wurden keine Unterschiede deutlich.

Für die Hühnerepidermis liegen bislang keine weiteren Untersuchungen zur Einzelanwendung von AE 3 vor, die einen Vergleich mit den eigenen Ergebnissen erlauben. Einzig in der Untersuchung von ARIAS et al. (1991) ließen sich gute Ergebnisse in aviärer Epidermis mit der Kombination AE1/AE3 erzielen, die sich damit gleichzeitig als Pan-Epidermismarker empfahl.

In Bezug auf die Lokalisation der Markierung von AE 3 in den Schichten der Epidermis, teilweise auch deren schwacher Farbintensität, stehen die eigenen Ergebnisse beim Huhn in Übereinstimmung mit denen beim Säuger. So konnte beispielsweise auch WALTER (1998) in immunhistochemischen Hautuntersuchungen des Hundes in allen Schichten der Epidermis und im Haarfollikel eine blassrosa Farbintensität feststellen. Dagegen beschrieben KOZAKI et al. (2001) eine eher kräftige Färbung in allen Schichten der kaninen Epidermis. Auch beim Menschen reagiert AE 3 in der gesamte Epidermis und das sogar mit teilweise kräftigerer Farbintensität im Stratum suprabasale als im Stratum basale, wobei auch bei dieser Spezies die Farbintensitäten nicht immer gleichmäßig ausgeprägt waren (WOODCOCK-MITCHELL et al., 1982). Da allerdings die jeweils verwendeten immunhistochemischen Färbemethoden und Färbeprotokolle der angeführten Autoren nicht einheitlich waren, ist ein Vergleich der einzelnen Farbintensitäten und -regelmäßigkeiten nur unter Vorbehalt möglich.

Der monoklonale Antikörper **LP 34** (CK 6, 18) reagierte in allen Altersgruppen mit deutlich regionaler Abhängigkeit. Während die suprabasalen Epidermisschichten der stark verhornten Schuppenhaut der Podotheca sowie des Pulvinus metatarsalis überwiegend kräftiger und regelmäßiger reagierte, zeigte das Stratum suprabasale in den federtragenden Hautregionen und in der Epidermis der Crista carnea eine schwächere bzw. nur eine sporadische Anfärbung. Die innere Scheide der Federfollikel wurde dagegen regelmäßig suprabasal mit einer schwachen bis mäßigen Intensität angefärbt. Die Färbeergebnisse von LP 34 belegen damit eine deutliche Abhängigkeit von den Hautregion und dies in beiden Nutzungsrichtungen. Eine Abhängigkeit vom Alter der Tiere konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Auch die Hornschicht wurde allein an den „skutellaten“ und den „retikulaten“ Schuppen markiert, wobei am Tarsometatarsus überwiegend die Scharnierregion mit LP 34 reagierte. Insbesondere die Anfärbung des Stratum corneum wird wiederum als eher unspezifisch bewertet, zumal in den stärker belasteten Regionen wie dem Sohlenballen die unzähligen Hornlamellen einfach als „Farbfänger“ dienen könnten. Auch könnte sich unter Berücksichtigung der besonderen histomorphologischen Strukturen in den „skutellaten“ Schuppen gerade die Scharnierregion eignen, größere Mengen Antikörperlösung während der immunhistochemischen Behandlung

anzustauen und deshalb durch Überfärbung ein kräftigeres Ergebnis als die übrigen Hornanteile aufzuweisen.

Untersuchungsergebnisse anderer Autoren mit LP 34 in aviärer Haut liegen nicht vor. Im Vergleich zu den Färberegebnisse anderer Vertebraten lassen nur die eigenen Ergebnisse deutliche Unterschiede in der Lokalisation der Färbung erkennen. Beim Hund wie beim Menschen färbt LP 34 die Epidermis sowohl basal als auch suprabasal mit kräftiger Intensität an (WALTER, 1998; KOZAKI et al., 2001). Beim Huhn läßt LP 34 dagegen ein selektives, suprabasales Markierungsverhalten in der Epidermis erkennen, das in seiner spezifischen Ausprägung auf ein typisches Zytokeratinvorkommen in den stärker belasteten Regionen hindeuten könnte.

Der CK 14- Antikörper **LL 002** zeigte ausnahmslos eine Markierung des Stratum corneum unabhängig von Alter und Nutzungrichtung allein in weiten Teilen der stärker verhornten, unbefiederten Hautgebiete. Die Ergebnisse waren dabei nicht immer regelmäßig. Da die Spezifität der Anfärbung der Hornschichten bereits bei den Antikörpern AE 1, AE 3 und LP 34 einer kritischen Betrachtung unterzogen wurde, gilt dasselbe auch für LL 002. Schon SCHMIDT et al. (1979) berichteten von unspezifischen Färbungen in den obersten Epidermisschichten der Hühnerhaut, die nicht für ein spezifisches Zytokeratinvorkommen sprechen können. Entsprechend ist die Markierung in der Hornschicht häufig nur als Ausdruck einer unspezifischen Farbensammlung in den mit Zwischenräumen versehenen Hornlamellen zu werten. Insgesamt erscheint damit die Anwendung aller hier einbezogenen Antikörper mittels immunhistochemischer Methoden wenig geeignet, das Stratum corneum auf ein spezifisches Zytokeratinvorkommen zu untersuchen.

Die eigenen immunhistochemischen Untersuchungen ergeben somit nach der Anwendung der monoklonalen Antikörper AE 1, AE 3, LP 34 und LL 002 ein komplexes Bild in der differenzierten Haut des Huhnes in Abhängigkeit von Alter und Region.

Um die Aktivität der monoklonalen Antikörper in **Abhängigkeit von verschiedenen Altersgruppen** zu überprüfen, wurden sechs Altersgruppen ausgewählt. Der Zeitpunkt, an dem die embryonale Epidermis erstmals adulte morphologische Charakteristiken ausgebildet hat (18. ET), wurde dabei ebenso berücksichtigt wie die

Federwechsel (Mausen) im ersten Lebensjahr des Huhnes, wenn infolge des Wachstums oder anderer Faktoren wie dem Sexualzyklus neue Epithelzellen bzw. neues Horn produziert wird und in schneller Abfolge bis zu vier neue Federgenerationen erscheinen (LUCAS und STETTENHEIM, 1972). Entsprechend sind der 1. Lebenstag durch die Erstlingsdunen, die 5. Lebenswoche durch das Jugendgefieder, die 11. und 15. Lebenswoche durch das Altersgefieder und schließlich die 22. Lebenswoche durch das Wechselgefieder geprägt.

Das vom Breitspektrum-Antikörper AE 1 erbrachte altersabhängige Färbeergebnis (Zunahme der Farbintensität in höherem Lebensalter) lässt auf einen fortschreitenden Anpassungsprozess an die endogenen und exogenen Bedingungen im Verlaufe des Lebens schließen, bei dem es möglicherweise zu einer gerichteten Veränderung der Zytokeratinexpression in der adulten Epidermis kommt. Ob diese Veränderungen dann letztendlich als direkte Folge äußerer Einflüsse auf die Haut zu werten sind und eine Erhöhung der Widerstandsfähigkeit der Haut adulter Tiere widerspiegeln oder allein durch innere Faktoren induziert werden bzw. Ergebnis besonderer Belastungssituationen wie einem erhöhten Stoffwechsel sind, können die immunhistochemischen Untersuchungen allein nicht näher erklären. Auch methodische Fehler beim immunhistochemischen Zytokeratinnachweis sind nicht vollständig auszuschließen, zumal Unterschiede im Farbmuster auch innerhalb der einzelnen Altersgruppen auftraten. In jedem Fall kann nach den eigenen Untersuchungen hervorgehoben werden, dass sich die Reaktionsmuster der aviären Epidermis bei juvenilen und adulten Tieren in Abhängigkeit vom Antikörper sichtbar unterscheiden lassen. Vergleichbare Arbeiten, bei denen das Markierungsverhalten monoklonaler Zytokeratinmarker auf eine Altersabhängigkeit hin untersucht worden wäre, liegen bisher weder beim Huhn noch bei anderen Tierarten vor.

Der **Einfluss der verschiedenen Hautregionen** auf das Markierungsverhalten einzelner monoklonaler Antikörper wurde anhand von morphologisch und histologisch sehr unterschiedlichen Hautgebieten geprüft. Es wurden extrem dünne, vornehmlich befiederte Hautregionen (Aptorium und Pterylae) extrem dicken, unbefiederten Hautregionen (Schuppengebiete der Podotheca und des Pulvinus metatarsalis) direkt gegenübergestellt, die die unterschiedliche funktionelle Beanspruchung widerspiegeln. Überdies wurde stellvertretend für ein Anhangsgebilde der Kamm des Huhnes (Crista carnosus) ausgewählt. Hierbei zeigte

vor allen anderen allein der Antikörper LP 34 deutliche Unterschiede im Markierungsverhalten. Die suprabasale Aktivität des Antikörpers beschränkte sich dabei auf einzelne Regionen wie die Federfollikel in den befiederten Gebieten oder die „skutellaten“ und „retikulaten“ Schuppengebiete an den unbefiederten Hinterextremitäten. Dieser selektiven Markierungstätigkeit eines Zytokeratinmarkers zufolge kann auch beim Huhn auf ein spezifisches Zytokeratinvorkommen geschlossen werden, das die Stabilität der Epidermis in Abhängigkeit von der Beanspruchung näher bezeichnet. Auch die Arbeit von WEISS et al. (1984) beim Menschen konnte belegen, dass das Expressionsprofil der Zytokeratine in der Epidermis die jeweilige Belastungssituation in einer Region spezifisch widerspiegeln kann und entsprechende Zytokeratine in den belasteten Regionen erscheinen.

Die Annahme, dass die beiden **Nutzungsrichtungen** der Hühner infolge genetischer linienabhängiger Differenzen und unterschiedlicher Haltungsbedingungen auch das Zytokeratinmuster beeinflussen könnten, bestätigte sich in den eigenen Untersuchungen nicht. Die Heterogenitäten in der Farbintensität bzw. Farbgelmäßigkeit zwischen der Legerichtung und der Mastrichtung scheinen mehr auf methodische Ursachen zurückzuführen sein, als dass sie durch die unterschiedliche genetische und umweltbedingte Faktoren hervorgerufen wären. Literaturangaben zum Einfluss der Nutzungsrichtung auf das Zytokeratinmuster beim Huhn oder bei anderen Nutztieren liegen nicht vor.

Ausgehend von den Markeraktivitäten der einzelnen monoklonalen Antikörper, die für die unterschiedlichen Zytokeratine des menschlichen Kataloges spezifisch sind (MOLL et al., 1982), sollten die eigenen Untersuchungen nicht zuletzt dazu dienen, **das Zytokeratinprofil der Hühnerepidermis** näher zu charakterisieren.

Durch O'GUINs et al. (1987) gelelektrophoretische Untersuchungen sind bereits einzelne Zytokeratine bekannt, die ebenso wie beim Menschen auch beim Huhn zur Grundausstattung der Epidermis gehören und möglicherweise permanent exprimiert werden. Das sind CK 1 und CK 5, die bei O'GUIN et al. (1987) im Immunblot mit dem Antikörper AE 3 reagierten, sowie das CK 14, das durch den Antikörper AE 1 markiert wurde. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen O'GUINs et al. (1987) können auch die eigenen positiven Färbeergebnisse mit AE 1 und AE 3 auf ein ständiges Vorkommen dieser Zytokeratine verweisen. Im Einzelnen kann die Aktivität

des Breitspektrumantikörpers AE 1 auf saure Typ-I-Keratine wie CK 10 und CK 14 zurückzuführen sein, während die Ergebnisse des Breitbandantikörpers AE 3 auf neutral-basische Typ-II-Keratine wie CK 1 und CK 5 im aviären Plattenepithel deuten.

Gleichzeitig wird beim Huhn (O'GUIN et al., 1987) wie bei anderen Vertebraten ein basales Vorkommen des Paares CK 5/14 als Kennzeichen mitotisch aktiver Keratinozyten (BYRNE et al., 1994; NELSON und SUN, 1983) sowie ein suprabasales Auftreten von CK 1/10 als Kennzeichen für verhornendes Plattenepithel (TSENG et al., 1982; KOPAN und FUCHS, 1989; LANE und ALEXANDER, 1990) angenommen. Daher muss das panepitheliale Färbeverhalten der Breitbandantikörper AE 1 (CK 10, 14, 16, 19) und AE 3 (CK 1, 5, 8) in den eigenen Untersuchungen auf die Expression weiterer Zytokeratine zurückgehen.

Eher auszuschließen ist dabei eine Reaktion mit zylinderepitheltypischen Zytokeratinen wie CK 8 oder CK 19 (VYBERG und MOLL, 2001), die bisher auch nur in einfach geschichteten aviären Epithelgeweben nachgewiesen werden konnten (ERICKSON et al., 1987; O'GUIN et al., 1987; PAGE, 1989).

Dagegen ist es nach den eigenen Untersuchungen durchaus möglich, dass das dynamische, altersabhängige Markierungsverhalten von AE 1 explizit auf einem Zytokeratin wie CK 16 beruht, dem eine stabilisierende Funktion in der humanen Epidermis zugeschrieben wird (JIANG et al., 1993), das aber bisher beim Huhn weder in normergischer noch in hyperproliferativer Epidermis nachgewiesen werden konnte (O'GUIN et al., 1987).

Beim Menschen wird CK 16 gemeinsam mit CK 6 als „Hyperproliferationskeratin“ bezeichnet. Beide Zytokeratine erscheinen in der humanen Haut nicht in gesunder interfollikulärer Epidermis, obwohl ihre jeweilige mRNA dort kontinuierlich exprimiert wird (TYNER und FUCHS, 1986). Allein in der äußeren Scheide der Haarfollikel (HEID et al., 1988) oder in hyperproliferierter Haut tauchen CK 6/16 beim Menschen regelmäßig auf (WEISS et al., 1984; STOLER et al., 1988, WATANABE et al., 1991). Dagegen konnten beim Hund CK 6 und CK 16 sowohl in gesunder als auch in tumorös veränderter Epidermis mittels SDS-PAGE permanent nachgewiesen werden (THOONEN et al., 1990; WALTER, 1998).

In den eigenen Untersuchungen lassen vor allem die markanten Veränderung der Farbtintensität nach AE 1-Anwendung in den verschiedenen Altersgruppen ein Vorkommen von CK 16 vermuten. Während in den frühen Altersgruppen (18.ET und

1.LT) CK 16 der nur wenige lebende Zellschichten umfassenden aviären Epidermis (LUCAS und STETTENHEIM, 1972) im Stratum basale eine höhere Grundfestigkeit verleihen könnte, scheinen mit höherem Lebensalter (5. LW bis 22. LW) dann außerdem die suprabasalen Zellschichten zunehmend auf äußere Beanspruchungen durch die Umwelt zu reagieren, indem die breiter werdenden Zonen mit kräftiger Färbintensität innerhalb des Stratum suprabasale ein Ausdruck einer vermehrten Expression von CK 16 wären.

Auch die Aktivität des Antikörpers LP 34 (CK 6, 18) in einzelnen Hautregionen deutet darauf hin, dass die aviäre Epidermis ihre Festigkeit mit Hilfe stabilisierender Zytokeratine erhöht. Mit der ausschließlichen Markierung des Stratum suprabasale in besonders beanspruchten Gebieten wie den Schuppenregionen und den Federfollikeln verweist dieser Antikörper allein auf das Vorkommen von CK 6, dem Partner von CK 16, während eine Reaktion mit CK 18, wiederum einem Zytokeratin der einfachen Epithelien (ERICKSON et al., 1987; PAGE, 1989), in der Epidermis eher ausgeschlossen werden kann.

Allerdings müssen in den eigenen immunhistochemischen Untersuchungen vor allem die Ergebnisse von AE 1 und AE 3 als Breitbandantikörper kritisch in Hinblick auf einen monospezifischen Zytokeratinnachweis betrachtet werden. Obwohl AE 1 und AE 3 in der Epidermis der Haut einschließlich der Federfollikel deutlich anfärbten, lassen die positiven Ergebnisse allein keine sicheren Aussagen über das Vorkommen einzelner Zytokeratine zu. Gleichzeitig machen die eigenen Ergebnisse deutlich, dass für einen Zytokeratinnachweis auch die Anwendung monospezifischer Antikörper wenig zufriedenstellend sein kann, zumal den fast ausnahmslos negativen Färbresultaten durchaus nur fehlende Kreuzreaktionen der gegen Zytokeratine des Menschen gerichteten Antikörper zugrunde liegen können. Zwar wurden erwartungsgemäß keine zylinderepitheltypischen Zytokeratine (CK 8, CK 18 und CK 19) mit monospezifischen Antikörpern wie CAM 5.2, Ks 18.04 und Ks 19.1 in der Epidermis visualisiert, aber es zeigten auch die plattenepitheltypischen Zytokeratine CK 10 mit DE-K 10 oder CK 14 mit LL 002 ein negatives Ergebnis in der basalen sowie in der suprabasalen Epidermis.

Der Antikörper LL 002 reagiert allein in der Hornschicht der Hühnerepidermis, was für ein Vorkommen von CK 14 in diesem Bereich sprechen könnte. Allerdings wurde das Färbverhalten von LL002 in der vorangegangenen kritischen Betrachtung als

eher unspezifisch gewertet, so dass nur mit Vorbehalt von einem CK14-Vorkommen im Stratum corneum ausgegangen werden sollte.

Zusammenfassend lässt sich aus den vorliegenden immunhistochemischen Färbergebnissen demnach auf das Vorliegen einer Reihe von Zytokeratinen in der aviären Epidermis schließen. Die Resultate nach Anwendung verschiedener monoklonaler Antikörper verweisen darauf, dass in der Basalschicht neben den CK 1 und CK 5 auch das CK16 vorkommt, während die Suprabasalschicht allein durch CK 6 und CK 16 geprägt ist. Auch die Epidermis der Federfollikel scheinen beim Huhn die gleichen Zytokeratine wie die interfollikuläre Epidermis aufzuweisen, also CK 1, CK 5 sowie CK 6 und CK 16. Nach den eigenen Untersuchungen könnte auch die Hornschicht epidermistypische Zytokeratine wie CK 1, 5, 6, 14, 16 exprimieren, jedoch ist dieses Ergebnis wie oben ausgeführt mit besonderer Vorsicht zu bewerten.

Damit bleibt festzustellen, dass sich allein mit dem regelmäßigen Vorkommen von CK 6 und CK 16 in der Epidermis das Zytokeratinmuster des Huhnes markant von dem anderer Vertebraten, insbesondere auch von dem des Menschen, unterscheidet.

Neben der Beachtung der Funktionen der Zytokeratine (FRANKE, 1993), bei der vor allem die dauerhafte Stabilisierung der dünnen aviären Epidermis im Vordergrund zu stehen scheint, gehen die Unterschiede zum Säuger vermutlich nicht zuletzt auf die frühe Stellung des Huhnes bei der Entwicklung der Organismenwelt (Evolution) zurück (FUCHS und MARCHUK, 1983). Unter den Gesichtspunkten, dass Zytokeratine evolutionär alte Bauelemente der Epidermis sind (FLAXMAN, 1972; FUCHS et al., 1981) und dass bekanntermaßen Vögel eine niedrigere evolutionäre Entwicklungsstufe als Säuger einnehmen (MAYR, 1979), kann eine andere Verteilung einzelner Mitglieder der Zytokeratinfamilie in aviärer Epidermis als in kaniner oder humaner Epidermis vermutet werden. Verschiedene Arbeiten zum Zytokeratinmuster bei Fischen als Wirbeltiere niederer evolutionärer Ordnung haben bereits größere Unterschiede in der integumentalen Zytokeratinexpression der Vertebraten herausgearbeitet (MARKL und FRANKE, 1988; BUTON, 1993). Möglicherweise kann nur so, spezifisch in den verschiedenen Stufen der Evolution und den äußeren und inneren Bedingungen entsprechend, ein hohes Maß an Anpassung an den jeweiligen Lebensraum erreicht werden.

Bei der Erstellung eines aviären Zytokeratinkataloges sind allerdings über die eigenen immunhistochemischen Untersuchungen hinaus weitere, vor allem auch vergleichende gelelektrophoretische Untersuchungen notwendig, um einen gesicherten Aufschluss über die Zytokeratinexpression in gesunder Hühnerepidermis zu geben. Außerdem sollte in weiterführenden Untersuchungen ein besonderes Augenmerk auf mögliche Änderungen der Zytokeratinmuster der Hühnerepidermis in pathologisch verändertem Hautmaterial gelegt werden, die pathogenetische Beiträge bei der Erforschung wirtschaftlich relevanter Hauterkrankungen des Geflügels liefern können.