

5. Zusammenfassung

Grundstrukturen des Zytoskeletts aller Epithelzellen sind die Zytokeratine. In den epidermalen Strukturen der Haut und ihrer Anhänge (Haare, Federn) sind bei Mensch und Tier komplexe Expressionsmuster verschiedener Zytokeratine (CK) nachweisbar, die den Typ und den Differenzierungsstatus einer Epidermiszelle reflektieren.

Um das bisher wenig untersuchte Zytokeratinmuster gesunder Hühnerhaut zu charakterisieren, sollte das Reaktionsvermögen einer breiten Palette von kommerziell verfügbaren monoklonalen Zytokeratinantikörpern immunhistologisch geprüft werden.

In Vorversuchen, die zugleich der Erarbeitung eines sicher anwendbaren Färbeprotokolls dienten, wurden zunächst 12 monoklonale Zytokeratinantikörper (mAK) an formalinfixiertem und paraffiniertem Hautprobenmaterial von vier Masthühnern der 5. Lebenswoche (LW) mit Hilfe eines Biotin-Streptavidin- (B-SA-) Testkits auf ein Markierungsvermögen hin untersucht. Nach Testung verschiedener Vorbehandlungen und unterschiedlicher Verdünnungsstufen der primären Antikörper sowie nach Modifikationen im Standardprotokoll des B-SA-Kits reagierten nur die Antikörper AE 1, AE 3, LP 34 und LL 002 mit einem positiven Ergebnis in Teilen der Epidermis.

In der anschließenden Hauptuntersuchung wurden diese vier positiv reagierenden Antikörper am Hautmaterial von 24 Legehühnern und 24 Masthühnern unterschiedlicher Altersstufen (18. ET, 1. LT, 5. LW, 11. LW, 15. LW und 22. LW) mit besonderem Augenmerk auf die Farbqualität (Farbintensität und Farbregelmäßigkeit) und auf die Lokalisation der Färbung in den einzelnen Schichten der Epidermis getestet. Dabei wurden in jeder Alterstufe jeweils sechs definierte Hautstellen (Pars pectoralis des Apterium ventrale, Pars pectoralis der Pteryla ventralis und Pars cruralis der Pteryla membri pelvici, Scuta/Scutella der Podotheca, Crista carnosae, Pulvinus metatarsalis) untersucht und verglichen.

Im Ergebnis visualisierte der Antikörper AE 1 das Stratum basale und das Stratum suprabasale der Epidermis. In der basalen Schicht war die Farbintensität weitgehend

kräftig, während die anfangs schwache Aktivität von AE 1 in den suprabasalen Zellschichten erst mit höherem Lebensalter (ab 5. LW) deutlich zunahm. Auch in der Hornschicht der Epidermis markiert AE 1 vielfach, aber eher schwach und unregelmäßig, was die Anfärbung nicht spezifisch erscheinen ließ. Die innere Scheide der Federfollikel zeigte wiederum eine kräftige und regelmäßige Anfärbung mit AE 1. Der Antikörper AE 3 reagierte bei den Hautproben mit schwacher Farbintensität im Stratum basale und im Stratum suprabasale der Epidermis. Auch in der Hornschicht zeigte AE 3 eine schwache und zudem vermehrt unregelmäßige Reaktion, während die Zellschichten der inneren Follikelscheide der Federn eine schwache, aber regelmäßige Anfärbung aufwies. Der Antikörper LP 34 zeigte eine lokalisationspezifische Aktivität. Mit LP 34 wurde allein die innere Scheide der Federfollikel und die suprabasale Schuppenhaut der Podotheca und des Pulvulus metatarsalis markiert. Die Anfärbung war dort zumeist kräftig und regelmäßig. Der monospezifische Zytokeratinmarker LL002 färbte nur Hornanteile an und wurde damit im Gegensatz zu den anderen positiv reagierenden mAK als wenig spezifisch eingestuft.

Im Vergleich der einzelnen Altersgruppen erbrachte allein der Antikörper AE 1 spezifische Ergebnisse. Die Hautproben juveniler und adulter Tiere zeigten dabei markante Unterschiede im epidermalen Reaktionsmuster, was als Ausdruck der Anpassung des aviären Zytokeratinpools an innere und äußere Faktoren gewertet werden kann. Im Vergleich der verschiedenen Hautregionen zeigte dagegen nur LP 34 ein spezifisches Markierungsvermögen, das in Abhängigkeit von der mechanischen Beanspruchung der Hautregion stand und eine erhöhte Festigkeit der Epidermis widerspiegelte. Demgegenüber zeigte der Vergleich von Lege- und Masthühnern keine Unterschiede im Markierungsmuster.

Letztlich kann das Markierungsverhalten der positiv reagierenden mAK auf das Vorliegen bestimmter Zytokeratine in der aviären Epidermis verweisen. So kann nach den Färbeargebnissen mit AE 1 und LP 34 ein regelmäßiges Vorkommen der sogenannten „Hyperproliferationskeratine“ CK 6 und CK 16 in gesunder Hühnerepidermis als stabilisierende Komponenten angenommen werden, die so beim Säuger nicht exprimiert werden.

6. Summary

Immunohistochemical studies of cytokeratin pattern in epithelial cells of chicken skin

Cytokeratins (CK's) are a major component of the cytoskeleton in all epithelial cells. Especially epidermal cells of the skin and its derivatives (hair, feather) show individual CK's in different combinations reflecting the cell type and the state of differentiation. Many of those complex expression patterns of cytokeratins have already been identified in both skin of humans and animals.

There are only few reports characterizing the CK pattern of chicken. To determine the expression pattern in normal chicken skin, the reactivity from a broad range of commercially available monoclonal antibodies were studied using an immunohistochemical method.

In preliminary examinations the application of 12 monoclonal antibodies to normal skin sections from four 5-week-old meat-type chickens was assessed. These studies were also used to elaborate a useful immunostaining report. The panel of monoclonal antibodies were employed as primary antibodies using a biotin-streptavidin (B-SA) detection system on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Having various test methods of pre-treatment and dilution of the primary antibodies used as well different modifications in the instruction guide of B-SA test-kit, the avian epidermis only reacted positively with four antibodies: AE 1, AE 3, LP 34 and LL 002.

In the main examination which followed the four positive antibodies were tested in skin samples obtained from 24 layer-type and 24 meat-type chickens in six different age groups (18th embryonic day, 1st day after hatching, 5th, 11th, 15th and 22 weeks after hatching). Special attention was given to the quality of immunostaining (intensity and regularity) and to the location of immunostaining in stratified epidermal tissues. Within these age groups, a selection of six skin regions (pars pectoralis of apterium ventrale, pars pectoralis of pteryla ventralis and pars cruralis of pteryla membri pelvici, metatarsus, crista carnosus and pulvinus metatarsalis) were examined and compared.

As a result, AE 1 antibody stained the basal cell layer and the suprabasal cell layers in the epidermis. Within the basal cell layer, the intensity of staining was mostly strong. In the suprabasal cell layers the intensity was weak first, but increased in higher age groups (beginning at 5-week of age). In comparison, AE 1 was always marked weakly and irregular in stratum corneum, so that the immunostaining in cornified layers seems to be non-specific. However, strong and regular reactivity was observed in inner sheath cells of feather with AE 1. AE 3 antibody reacted with weak intensity in stratum basale and in stratum suprabasale of the epidermis. In addition, the basal and suprabasal immunostainings were frequently irregular. Further, AE 3 marked weakly and frequently irregularly in epidermal stratum corneum formation. In contrast to interfollicular epidermis, weak, but regular reactivity was noted in the inner sheath of feather follicles with AE 3. LP 34 antibody showed specific results in different regions of skin. It stained the epidermis in inner sheath cells of feather and in suprabasal cell layers from scutate and reticulate scales. These results were distinctly strong and regular. The antibody LL 002 stained only cells from stratum corneum formation. The exclusive reactions in horny layers are the reason for the assumption that LL 002 is more non-specific than other positive antibodies.

In separate age groups, only AE 1 was marked specifically. Epidermal reactivity was distinctly different in skin samples obtained from either juvenile or adult animals. Presumably, the differences in staining with AE 1 are based on cytokeratin adaptation to inner and outer requirement. An influence of skin region only was found with LP 34. Its reactivity in epidermis was dependent on mechanical use of skin and suggested to the increase of strength in epidermis. On the other hand, differences between layer-type chicken and meat-type chicken were not proved with any antibody used here.

The results of positive antibodies suggested the prevalence of certain cytokeratins in chicken epidermis. In contrast to mammals, the expression of CK 6 and CK 16 suggests the prevalence of the so-called "hyperproliferation keratins" in normal chicken skin, which stabilize the thin chicken skin.