

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin in der Leber der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

***Zusammenfassung:** In Fischen wird der Dotterprotein-Vorläufer Vitellogenin in der Leber weiblicher oviparer Vertebraten als Antwort auf im Blut zirkulierendes Estrogen synthetisiert. Vitellogenin wird ins Blut abgegeben, von den Ovarien aufgenommen und in die Dotterproteine gespalten. Zum Nachweis des Proteins in den Hepatocyten von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) wurden Männchen und Weibchen intraperitoneale mit  $17\beta$ -Estradiol (1 mg/kg Körpergewicht) gespritzt. Während Vitellogenin in den Lebern der Kontrollmännchen nicht nachgewiesen werden konnte, produzierten Fische beider Geschlechter nach einmaliger  $17\beta$ -Estradiol-Injektion Vitellogenin. Induzierte Männchen zeigten das gleiche Muster der Antikörperbindung wie die Weibchen. Bei den Männchen war allein die Bindungsintensität geringer als bei den Weibchen. Nach lichtmikroskopischer Untersuchung zeigte sich die Antikörperreaktion vor allem in den perinukleären Regionen, in denen neben anderen Organellen vor allem das rauhe endoplasmatische Retikulum und die Golgi-Felder lokalisiert sind. Ultrastrukturelle Beobachtungen konnten diese Organellen als Orte der Vitellogeninsynthese bestätigen.*

#### 3.1.1 Einleitung: Vitellogeninsynthese - ein Biomarker für Estrogen- und Xenoestrogen-Belastung?

In oviparen Vertebraten stellt die Vitellogenese einen Schlüsselprozess dar, der für die Oocytenreifung von maßgeblicher Bedeutung ist (Anderson et al., 1996). Das Plasmavorläuferprotein der Eidotterproteine, Vitellogenin, wird in der Leber synthetisiert, lipidisiert, phosphoryliert und glykosiliert. Von dort wird es ins Blut abgegeben und zu den Gonaden transportiert, wo es über Kapillare weitergeleitet wird. Zur Oocytenoberfläche gelangt Vitellogenin über Kanäle zwischen den die Oocyten umgebenden Follikelzellen. Die Aufnahme des Moleküls durch die Oocyten erfolgt durch selektive Pinocytose. Nach seiner Aufnahme wird Vitellogenin proteolytisch in Phosvitin und Lipovitellin gespalten (Wahli et al., 1981).

Vitellogenin kommt normalerweise nur im Serum geschlechtsreifer Weibchen vor (Hara et al., 1980; Wallace und Selman, 1982). Nach künstlicher Induktion sind jedoch auch Männchen und unreife Weibchen in der Lage, Vitellogenin zu synthetisieren (Purdom et al., 1994).

Die Vitellogeninsynthese kann bei männlichen und weiblichen oviparen Vertebraten durch Injektion oder Fütterung von (Xeno-)Estrogenen oder die Exposition über das Wasser ausgelöst werden (Wangh and Knowland, 1975; Emmersen and Petersen, 1976; Knowland, 1978; De Vlaming et al., 1980). Die durch (Xeno-)Estrogene hervorgerufene Induktion der Proteinsynthese verdient angesichts der zunehmenden Gewässerverschmutzung mit natürlichen Estrogenen und zahlreichen Chemikalien mit estrogenähnlicher Wirkung große Beachtung (Purdom et al., 1994; Harries et al., 1995; Sumpter, 1995; Folmar et al., 1996; Lech et al., 1996; Mellanen et al., 1996; Ren et al., 1996a, b). Das Vorhandensein von Vitellogenin in der Leber und im Serum männlicher Fische kann als Biomarker der Exposition gegenüber (xeno-)estrogenähnlichen Chemikalien genutzt werden (Pelissero et al., 1993; Heppell et al., 1995; Tyler et al., 1996; Palmer et al., 1998). Eine Vielzahl von Methoden zum Nachweis von Vitellogenin im Plasma (Folmar et al., 1996; Kramer et al., 1998) und der Leber (Pacoli et al., 1991; Lech et al., 1996; Ren et al., 1996a, b) stehen bereits zur Verfügung.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Vitellogenin sowohl in der Leber weiblicher als auch männlicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit Hilfe immunhistochemischer und immunocytochemischer Techniken sichtbar zu machen. Als Positivkontrolle konnten die Dotterproteine Phosphitin und Lipovitellin in den reifen Oocyten der weiblichen Regenbogenforellen nachgewiesen werden. Unter der Voraussetzung, dass ein geeigneter Antikörper zu Verfügung steht, bieten die durchgeführten Methoden ein geeignetes Werkzeug, selbst kleine Vitellogeninmengen in der Fischleber zu einem frühen Zeitpunkt der Synthese nachzuweisen.

### 3.1.2 Nachweis von Vitellogenin in der Leber und den Ovarien der Regenbogenforelle

#### 3.1.2.1 Vorversuche

Mit dem Ziel neben einer möglichst hohen Strukturhaltung auch eine möglichst optimale Antigenizität des Gewebes zu erhalten, wurden eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt in denen neben verschiedenen Fixierungsmethoden, unterschiedliche immunhistochemische Techniken angewendet wurden. Ein Teil der Leber- und Gonadengewebeproben wurden nach Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, während ein anderer Teil in Paraffin eingebettet wurde.

Als optimal stellte sich das Schockgefrieren, nach der Perfusions-Fixierung im Immunfixans (siehe Kap. 2.1) heraus. Bei dieser Methode konnte eine hohe Strukturhaltung und eine optimale Antigenizität festgestellt werden.

Eine weitere Verbesserung der immunhistochemischen Untersuchung ergab sich durch die Aufreinigung des primären polyklonalen Antiserums gegen Regenbogenforellenvitellogenin über eine Protein G-Säule. Hierdurch ließen sich die unspezifischen Bindungen des Antiserums an das Lebergewebe stark reduzieren. Auch durch die Verkürzung der Antikörper-Inkubationszeiten und die höhere Verdünnung des zweiten Antikörpers konnte eine Verringerung der unspezifischen Bindungen und damit eine Optimierung der Methode erreicht werden.

### *3.1.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin in der Leber und den Gonaden adulter Regenbogenforellen*

#### *Kontrollen*

An den Leberschnitten der männlichen Regenbogenforellen, die eine Ethanol-Injektion erhalten hatten, konnte keine vitellogeninpositive Reaktion nachgewiesen werden. Das Lebergewebe zeigte sich weitgehend unsichtbar. Vereinzelt auftretende, schwach fluoreszierende Stellen, rührten von Verunreinigungen bzw. Unregelmäßigkeiten der Schnittdicke her. Auch in den Kontrollorganen Niere und Muskulatur war kein durch Vitellogenin hervorgerufenen Signal erkennbar.

#### *Leber weiblicher Regenbogenforellen nach einmaliger 17 $\beta$ -Estradiol-Injektion*

In der Leber weiblicher Regenbogenforellen konnte Vitellogenin vor und nach Induktion durch 17 $\beta$ -Estradiol nachgewiesen werden. Eine deutliche stärkere vitellogeninpositive Färbung der Leber zeigte sich an Kryoschnitten im Vergleich zu Paraffinschnitten. Die Immunreaktion war vor allem in der Peripherie des Hepatocytenucleus nachweisbar (Bildtafel 1 und Bildtafel 2, Bild 2a), dem Bereich, wo sich die Mehrzahl der Golgi-Felder und große Mengen an rauhem endoplasmatischem Retikulum befinden (Bildtafel 4, Bild 4a). Neben der spezifischen interzellulären Bindung des Antikörpers war eine starke Färbung im Bereich des Endothels (wahrscheinlich dem Disseschen Raum) der Pfortader und der kleineren Sinusoide sichtbar, während die Gallengänge unmarkiert blieben. In Folge der Perfusion blieb das Lumen der Blutgefäße selbst frei von vitellogeninpositivem Material.

Die durch den Antikörper hervorgerufene Färbung des Leberparenchyms war nicht gleichmäßig. Vielmehr wiesen einige Hepatocyten mehr Reaktionsprodukte auf als andere. Zellen ohne Reaktionsprodukte schienen zwischen die vitellogeninpositiven Zellen eingestreut zu sein (Bildtafel 1 und Bildtafel 2, Bild 2a).

*Leber männlicher Regenbogenforelle nach einmaliger Injektion von 17 $\beta$ -Estradiol*

Bei den mit 17 $\beta$ -Estradiol induzierten Männchen war Vitellogenin in der Leber in ähnlicher Weise wie bei den Weibchen nachweisbar. Allerdings war hier die Bindungsintensität des Antikörpers aufgrund der wahrscheinlich geringen Vitellogeninmenge deutlich schwächer. Weiterhin enthielten weit weniger Hepatocyten vitellogeninpositives Material.

*Ovarien mit und ohne Injektion von 17 $\beta$ -Estradiol*

In den Ovarien war eine vitellogeninpositive Reaktion an den reifen Eiern (Reifestufe III) nachweisbar (Bildtafel 3, Bild a). Markiert waren ca. 300 – 1000  $\mu$ m große Dottertropfen, während die Cortikalvesikel unmarkiert blieben (Bild 3a, b). Weiterhin ließ sich eine Kreuzreaktion zwischen Antikörper der aus zwei Schichten aufgebauten Vitellinhülle reifer Oocyten erkennen (Bild 3b). Oocyten der Reifestufe I und II zeigten keine positive Immunmarkierung (Bild 3a).

---

**Bildtafeln siehe folgende Seiten:**

**Bildtafel 1:** Kryoschnitte durch perfundiertes Lebergewebe einer weiblichen Regenbogenforelle 4 Tage nach 17 $\beta$ -Estradiol-Injektion und nach Immunmarkierung von Vitellogenin. In einem Teil der Hepatocyten ist eine starke Markierung von Vitellogeninclustern in der perinukleären Region der Hepatocyten zu sehen (gelbe Punkte; ►). **a:** Eine positive Vitellogeninmarkierung ist daneben auch im Bereich des Endothels der Sinusoide (vermutlich im Disseschen Raum; →) zu erkennen (Vergrößerung: 600  $\times$ ). **b:** Bei höherer Vergrößerung wird die Lokalisation von Vitellogenin in der Nähe des Zellkerns deutlich (►; Vergrößerung: 1500  $\times$ ).

**Bildtafel 2:** Kryoschnitte: **a:** durch perfundiertes Lebergewebe einer weiblichen Regenbogenforelle 4 Tage nach 17 $\beta$ -Estradiol-Injektion und nach Immunmarkierung von Vitellogenin. Das Lebergewebe wurde mit Evans Blue gegengefärbt. In einigen Hepatocyten ist eine positive Markierung in der perinukleären Region zu sehen (→; Vergrößerung: 600  $\times$ ). **b:** durch perfundiertes Lebergewebe einer männlichen Regenbogenforelle 4 Tage nach 17 $\beta$ -Estradiol-Injektion, Vitellogenin-Markierung und Gegenfärbung mit Evans Blue. Das erkennbare Signal (→), hervorgerufen durch die Bindung des Antikörpers an Vitellogenin in der Kernregion, ist deutlich schwächer als bei den Weibchen. Weiterhin ist in weit weniger Hepatocyten eine positive Immunreaktion erkennbar (Vergrößerung: 600  $\times$ ).

**Bildtafel 3: a und b:** Kryoschnitte durch die Gonaden einer weiblichen Regenbogenforelle, nach Vitellogenin-Markierung und Gegenfärbung mit Evans Blue. Zu erkennen sind Oocyten verschiedener Reifestufen. In den Oocyten der Reifestufe III sind Vitellogenin-markierte Dottertropfen und eine Vitellogenin-positive Reaktion der Vitellin-Hülle sichtbar. Die angeschnittene unreife Oocyte (Oocyte Reifestufe I) ist unmarkiert. (►; Vergrößerungen: **a:** 600  $\times$ ; **b:** 1000  $\times$ ).

**Bildtafel 1:** *Beschreibung siehe Seite 30.*

**Bildtafel 2:** *Beschreibung siehe Seite 30.*

**Bildtafel 3:** *Beschreibung siehe Seite 30.*

Bildtafel 1

Bildtafel 2

Bildtafel 3

3.1.2.3 *Immuncytochemischer Nachweis von Vitellogenin in der Leber und den Gonaden adulter Regenbogenforellen*

In den Hepatocyten der weiblichen und männlichen Regenbogenforellen konnte, 4 Tage nach Injektion mit  $17\beta$ -Estradiol, Vitellogenin nach Markierung mit einem Gold-gekoppelten Antikörper im Bereich der Golgi-Felder und am rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) nachgewiesen werden (Bildtafel 4a, b).

Bei den  $17\beta$ -Estradiol gespritzten männlichen Regenbogenforellen zeigte sich eine starke Akkumulation von Vitellogenin im Bereich des rER (Bild 4b).

---

**Bildtafel 4 a:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Hepatocyte einer unbelasteten Regenbogenforelle. Zu erkennen ist der zentral gelegene Nucleus, ausgedehnte Stapel rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER), in die wenige Mitochondrien eingestreut sind, Golgi-Felder mit Golgi-Vesikeln und zahlreiche Lysosomen (Vergrößerung: 8000  $\times$ ). **b:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Leberzelle einer männlichen Regenbogenforelle nach  $17\beta$ -Estradiol-Injektion; markiert mit Protein A-Gold-markiertem Anti-IgG gerichtet gegen Vitellogeninantikörper. Zu erkennen ist eine positive Markierung entlang der Membran des rauhen endoplasmatischen Retikulums (Vergrößerung 100000  $\times$ ).

**Bildtafel 4**

### 3.1.3 Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung konnte mit Hilfe immunhistochemischer Methoden die Lokalisierung von Vitellogenin in Hepatocyten und reifen Oocyten der Regenbogenforelle gezeigt werden. Vitellogenin war sowohl an Paraffinschnitten als auch an Kryoschnitten nachweisbar, wobei die Gewebeerhaltung des bouinfixierten und Paraffin-eingebetteten Materials besser, die Antikörperbindung jedoch im Vergleich zu den Gefrierschnitten deutlich schlechter war. Verluste in der Antigenizität der paraffineingebetteten Proben beruhen wahrscheinlich auf der partiellen Denaturierung des nachzuweisenden Antigens als Konsequenz der chemischen Fixierung und Entwässerung (Stein et al., 1985). Die immunopositive Reaktion an Schnitten weiblicher Gonaden zeigte die Fähigkeit des Antikörpers, auch die Abbauprodukte von Vitellogenin, Lipovitellin und Phosvitin zu erkennen und zu binden.

Bereits nach einmaliger  $17\beta$ -Estradiol-Injektion konnte Vitellogenin in den Hepatocyten männlicher Regenbogenforellen mit nahezu gleicher Intensität wie im weiblichen Lebergewebe markiert werden. Die Induktion der Vitellogeninsynthese in männlichen und weiblichen oviparen Vertebraten, hervorgerufen durch  $17\beta$ -Estradiol-Injektion oder -Fütterung, ist bereits in zahlreichen *In vivo*-Studien beschrieben (Aida et al., 1973; Wangh und Knowland, 1975; Emmersen und Petersen, 1976; Knowland, 1978; De Vlaming et al., 1980; Medda et al., 1980; Sand et al., 1980; Lin und Chan, 1981; Sundararaj und Nath, 1981; Bradley und Grizzle, 1989), und auch *in vitro* konnte die Vitellogeninproduktion an estrogeninduzierten Hepatocyten gezeigt werden (Dolphin et al., 1971; Plack und Fraser, 1971; Merry et al., 1973; Schrim et al., 1973; Wangh und Knowland, 1975; Copeland und Thomas, 1988; Bradley und Grizzle, 1989). Immunhistologische Untersuchungen zur Lokalisation von Vitellogenin innerhalb der Leber von Fischen, wie sie im Rahmen dieser Dissertation an Regenbogenforellen gezeigt werden konnte, sind jedoch bislang nur selten zu finden (Pacoli et al., 1991; Wahli et al., 1998).

In der vorliegenden Studie konnte eine vitellogeninpositive Reaktion in der Leber von allen induzierten Regenbogenforellen nachgewiesen werden. Auffallend war allerdings, dass nicht alle Hepatocyten in gleicher Weise markiert waren. Vielmehr waren in allen untersuchten Lebern immer auch unmarkierte Zellen nachweisbar, die zwischen die immunpositiven Zellen eingestreut waren. Auffällig war auch, dass der Anteil induzierter Leberzellen bei den weiblichen Tieren höher war als bei den Männchen, denen  $17\beta$ -Estradiol injiziert wurde. Die inhomogene Verteilung der Reaktionsprodukte in der Leber von Fischen ist in der Literatur mehrfach beschrieben. Beispielsweise konnten Pacoli et al. (1991) sowohl an Kryo- als auch an Paraffinschnitten von Welslebern und Nunomura et al. (1983) an Lebern verschiedener Salmoniden nach Estradiolinduktion eine ungleiche Bindung der Vitellogeninantikörper an die Hepatocyten zeigen.

Die diskontinuierliche Vitellogenininduktion in den Leberzellen von männlichen und weiblichen Forellen lässt sich vielleicht durch das bei geschlechtsreifen Weibchen im Blut zirkulierendem  $17\beta$ -Estradiol erklären. Aufgrund der längeren Einwirkungszeiten des Hormons auf die weiblichen Regenbogenforellen könnte es zu einer erhöhten Vitellogeninproduktion in den Hepatocyten gekommen sein. Für diese Theorie spricht eine Studie von Lin und Chan (1981), die nach 14tägiger anhaltender Diethylstilbestrol (DES)-Stimulation an Hühnerhepatocyten eine um 20 % erhöhte Anzahl positiv reagierender Zellen im Vergleich zur einmaligen DES-Stimulation nachweisen konnten.

Für das Vorhandensein Vitellogenin-negativer Zellen in den Lebern der untersuchten männlichen und weiblichen Regenbogenforellen gibt es eine Reihe möglicher Erklärungen. Beispielsweise könnte das Fehlen einer Immunmarkierung bei einigen Zellen daran gelegen haben, dass diese ihr Vitellogenin bereits in das Blut abgegeben hatten. Hepatocyten natürlich und artifiziell Vitellogenin-induzierter Regenbogenforellen haben eine geringe Speicherkapazität für Vitellogenin (van Bohemen et al., 1982). Auch könnte das Vorhandensein unmarkierter Hepatocyten in einer Spezialisierung dieser Zellen auf die Synthese anderer Proteine (wie Albumine) begründet sein (Pacoli et al., 1991). Bei Hühnern beispielsweise deuten immunocytochemische Studien darauf hin, dass nur spezielle Hepatocyten für die Synthese der Ovalbumine und Vitellogenine zuständig sind (Lin und Chan, 1981). Ob auch bei Regenbogenforellen eine solche Spezialisierung der Leberzellen vorkommt, ist bislang allerdings noch unklar.

Aber nicht nur in den Hepatocyten, sondern auch im Bereich der luminalen Oberfläche einiger Endothelzellen (vermutlich im Disseschen Raum) der Pfortader und der Zentralvenen konnte Vitellogenin nachgewiesen werden. Diese Anwesenheit von Vitellogenin entlang des Endothels war zu erwarten, da das Protein über das Blut zu den reifenden Oocyten der Gonaden transportiert wird, wo es über Endocytose aufgenommen wird (Selman and Wallace, 1982; Nagahama, 1983). Vitellogenin, das in die Oocyten aufgenommen wird, scheint anschließend sofort in die Dotterproteine umgebaut zu werden, die sich innerhalb membrangebundener Dottertropfen anreichern (Selman und Wallace, 1983, 1986). In Übereinstimmung mit anderen Studien konnte eine immunpositive Reaktion mit dem Vitellogeninantikörper nur in den reifen Oocyten nachgewiesen werden (Hamazaki et al., 1987), Oocyten der Reifestufen I und II zeigten keine immunpositive Reaktion. Markiert waren ca. 300 – 1000  $\mu\text{m}$  große Dottertropfen, während die Corticalvesikel unmarkiert blieben. Dieses Ergebnis korreliert mit den Beschreibungen von Hamazaki et al. (1987) an Oocyten des Medaka (*Oryzias latipes*). Entsprechend den von Hyllner und Haux (1992) dargestellten Ergebnissen war auch eine sehr deutliche Markierung der aus zwei Schichten aufgebauten Vitellinhülle reifer Oocyten zu erkennen (Hagemaijer, 1973; Kobayashi, 1982). Die hier vorgestellte, immunhistochemische Methode hat sich als wertvolle Technik für den Nachweis von Vitellogenin am Synthesort sowie seiner Abbauprodukte, den Eidotterproteinen, im Zielorgan erwiesen. Weitergehende Untersuchungen auf dem ultrastrukturellen Niveau, wie sie in Ansätzen durch immuncyto-

chemische Methoden gezeigt werden konnten, können helfen, die exakte Lokalisation des Vitellogeninsynthesortes in der Fischleber aufzuklären. Einer der größten Vorteile der Immunlokalisation ist, dass nur sehr geringe Probenmengen für einen erfolgreichen Nachweis von Vitellogenin ausreichen, so dass sehr kleine Fische einzeln untersucht werden können. Es müssen jedoch weitere Studien folgen, die zeigen können, ob die immunhistochemische Methode sensitiv genug ist, die Vitellogenininduktion bei Tieren nachzuweisen, die umweltrelevanten Konzentrationen estrogen aktiver Stoffe über das Wasser ausgesetzt sind.

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Immunhistochemischer Nachweis von Vitellogenin in der Leber der Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) .....</i></b>	<b>27</b>
3.1.1	Einleitung: Vitellogeninsynthese - ein Biomarker für Estrogen- und Xenoestrogen- Belastung? .....	27
3.1.2	Nachweis von Vitellogenin in der Leber und den Ovarien der Regenbogenforelle .....	28
3.1.3	Diskussion .....	36