

Forelle Karpfen u.a.

Vitellogenin

Eidotter-Vorläuferprotein

Labortest zur Bestimmung des Östrogenstatus bei Fischen

In oviparen Tieren ist Vitellogenin ein Eidotter-Vorläuferprotein, welches in der Leber durch östrogene Induktion während der Hauptphase des Oozytenwachstums gebildet wird. Das Protein wird über den Blutstrom zu den Ovarien transportiert und dort in die Dotterproteine Lipovitellin 1, Lipovitellin 2 und Phosvitin gespalten. Diese Dotterproteine dienen als Nahrungsvorrat für die sich entwickelnden Embryos.

Neuere Untersuchungen haben ein großes Spektrum an in der Umwelt vorhandenen Chemikalien aufgezeigt, die bei Wirbeltieren endokrine Effekte zeigen. Insbesondere Östrogeneffekte werden durch eine Interaktion mit dem Östrogenrezeptor vorgetäuscht [1]. Diese Xenoöstrogene induzieren auch eine Vitellogenin-Synthese in männlichen und jungen Fischen und können, z.B. nach Exposition mit Abwässern, zu Reproduktionsstörungen führen [2,3,4,5]. Somit ist die Anwesenheit von Vitellogenin bei männlichen Fischen ein brauchbarer Biomarker um östrogene Aktivität von natürlichen und anthropogenen Substanzen in Abwässern zu bestimmen.

Verwendung des Vitellogenintests

Je nach Zielrichtung oder Verwendung eines Vitellogenin-Tests werden weibliche, männliche oder juvenile Fische untersucht. Hierbei handelt es sich um sehr vielfältige und sehr verschiedene Forschungs- oder Untersuchungsgebiete. Neben rein grundlagenorientierte zoologische oder entwicklungsbiologische Studien sind vermehrt z.T. routinemäßig durchgeführte ökologische und ökotoxologische Zielrichtungen ein steigendes Einsatzgebiet für die Untersuchung von Vitellogenin [6].

Wichtige Einsatzgebiete beim Fisch sind:

- Bestimmung des Östrogenstatus
- Bestimmung des Status der sexuellen Entwicklung
- Identifizierung der Geschlechter wenn kein Geschlechtsdimorphismus vorhanden ist.
- Nachweis von östrogenen Wirkung bei natürlichen oder anthropogenen Substanzen oder Chemikalien.
- Untersuchung von Gewässern oder Abwässer auf östrogenwirksame Substanzen.

Messtechnische Besonderheiten von Vitellogenin

Vitellogenin ist dadurch gekennzeichnet, dass es abhängig von der Fischart sehr leicht zerfällt bzw. abgebaut wird [7]. Dies verlangt sowohl bei der Probennahme als auch bei der Testdurchführung ein gewissenhaftes und standardisiertes Vorgehen: Proben sollten bei Bedarf routinemäßig mit Proteaseinhibitoren versetzt werden und/oder sofort gekühlt und direkt nach Serum- oder Plasmagewinnung eingefroren werden. Ein wiederholtes Auftauen/Einfrieren ist ohne gravierende Verluste nicht möglich. Aus diesem Grunde ist ein Einfrieren von Aliquots essentiell und Vitellogenin sollte der erste Parameter sein, der in einer Probe bestimmt wird.

Ähnliches gilt auch für die Vitellogenin-Testdurchführung. Hier muss der Test unmittelbar nach Auftauen der Proben durchgeführt werden. Vitellogenin-Standard und Tracer liegen für den Test in lyophilisierter Form vor. Nach dem Ansetzen der Lösungen müssen diese sofort gebraucht werden. Ein Wiedereinfrieren ist nur äußerst begrenzt möglich. Allein bei dieser Handhabung handelt es sich um einen quantitativen Test.

Diese technischen Einschränkungen sind durch das Protein Vitellogenin selbst bedingt. Der Unterschied bezüglich der einzelnen Fischarten ist relativ groß [7]. Somit haben alle immunologischen und elektrophoretischen Bestimmungsmethoden mit diesem Problem zu kämpfen und werden darum z.T. als halbquantitative Methoden angeboten.

Der Labortest

Der Test ist zwar sehr spezifisch für Vitellogenin zeigt aber Kreuzreaktionen zum Vitellogenin verschiedener Fische. Validiert ist der Test für:

Regenbogenforelle	(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
Karpfen	(<i>Cyprinus carpio</i>)

Ausreichende Kreuzreaktionen zur Entwicklung von spezifischen Tests sind für folgende Fischarten vorhanden:

Flussbarsch	(<i>Perca fluviatilis</i>)
Plötze (Rotauge)	(<i>Rutilus rutilus</i>)
Brasse (Brachse, Blei)	(<i>Abramis brama</i>)

Wie die aufgeführten Arten zeigen, ist das Spektrum an messbaren Arten breit, so dass auch für viele nicht genannte Arten schnell spezifische Tests zur Verfügung gestellt werden können. Insbesondere dürften viele Cypriniden messbar sein.

Der Vitellogenintest wird für jede einzelne Fischart separat standardisiert und validiert!

Testprinzip

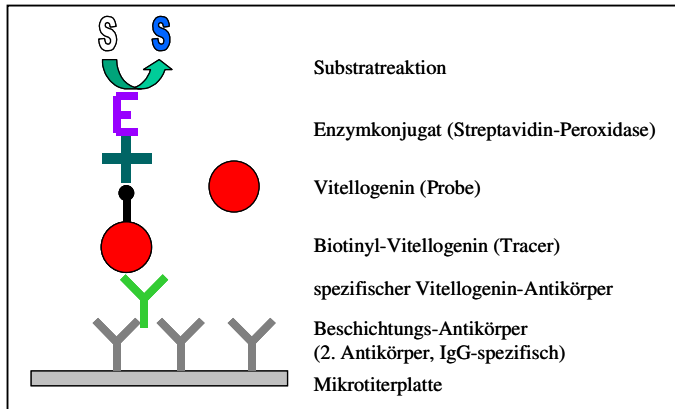


Abb. 1

Bei diesem Test handelt es sich um einen kompetitiven ELISA, bei dem Vitellogenin aus der Probe mit Biotin-markiertem Vitellogenin um eine begrenzte Zahl an Antigen-Bindungsstellen konkurriert. An das markierte Vitellogenin bindet das Enzymkonjugat, welches durch eine Farbreaktion photometrisch bestimmt werden kann.

Testcharakterisierung

Das für die einzelnen Tests als Standard und für die Tracersynthese benötigte Vitellogenin wurde und wird laufend neu gereinigt. Dies geschieht durch eine fischartspezifische Kombination aus Fällung, Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Als Ausgangsmaterial dient Serum oder Plasma von weiblichen Fischen kurz vor der Laichreife.

Testcharakterisierung (Forelle)

Testdauer	ca. 4 Stunden	
Antiserum	1:30.000-1:40.000	Kaninchen-anti-Karpfen-Vitellogenin
Tracer	Biotinyl-Vitellogenin	(Forelle)
Standard	Vitellogenin	(Forelle)
Probe	Serum oder Plasma	
Wiederfindung*	103 ± 8,5%	
Intraassay-CV**	10,9%	
Interassay-CV**	< 15%	
Kreuzreaktion zu anderen Proteinen	nicht bekannt	

* Zugabe von 3 verschiedenen Konzentrationen Standard-Vitellogenin zu jeweils einer männlichen und einer weiblichen Serumprobe.

** Vorläufige Daten

Testdurchführung (Kurzbeschreibung)

1. Probenvorbereitung (Vorverdünnung je nach Geschlecht, Alter und Laichstatus: 1:10 bis 1:10.000)
2. Vorbereitung der Standard- und Tracer-Gebrauchslösungen
3. 50 µl Tracer-Lösung
50 µl Standard, Kontrolle oder Proben-Vorverdünnung hinzufügen
50 µl Antiserum-Lösung hinzufügen
Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur
4. Waschen der Mikrotiterplatte
5. 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Lösung
Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur
6. Waschen der Mikrotiterplatte
7. 150 µl TMB-Substrat
Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur
8. Abstoppen der Substratreaktion mit 60 µl Oxalsäure
9. Extinktionsmessung im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 595-630)

Literatur

- [1] Stahlschmidt-Allner P, Allner B, Römbke J, Knacker T (1997) Endocrine disrupters in the aquatic environment. *Environ Sci Pollut Res Int* 4, 155-162.
- [2] Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guilette Jr LJ (1996) Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 104, 1096-1101.
- [3] Lomax DP, Roubal WT, Morre JD, Johnson LL (1998) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Comp Biochem Physiol* 121B, 425-436.
- [4] Gronen M, Denslow N, Manning S, Barnes S, Barnes D, Brouwer M (1999) Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ Health Perspect* 107, 385-390.
- [5] Shioda T, Wakabayashi M (2000) Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 40, 239-243.
- [6] Sherry J, Gamble A, Fielden M, Hodson P, Burnison B, Solomon K (1999) An ELISA for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens. *Sci Total Environ* 225, 13-31.
- [7] Hennies M, Wiesmann M, Allner B, Sauerwein H (2003) Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. *Sci Total Environ* 309, 93-103.