

Das Rätsel vom Thunersee

–

Neun Jahre epidemiologische und ätiologische Abklärungen zu
anormalen Veränderungen der Geschlechtsorgane bei Felchen
(*Coregonus lavaretus*)



Daniel Bernet

*Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin,
Institut für Tierpathologie, Vetsuisse Fakultät,
Länggass-Strasse 122, Postfach, CH-3001 Bern*

&

David Bittner

*Abteilung Populationsgenetik (CMPG)
Institut für Evolution und Ökologie, Universität Bern,
Baltzerstrasse 6, CH-3012 Bern*

unter der Leitung von: Prof. Dr. H. Segner

unter der Leitung von: PD Dr. C.R. Largiadèr

Titelbild: David Bittner mit Berufsfischer Remo Grimm auf dem Bielersee beim Einholen des Tagesfangs. Kleine Bilder: Links oben: Männchen mit normalen Hoden. Links darunter: Männchen mit kompartimentierten und verwachsenen Hodenloben; Mitte oben: Zwitterhoden mit testikulären und ovariellen Teilen; Rechts oben: Weibchen mit normalen Eierstöcken; Rechts darunter: Weibchen mit verwachsenen Eierstöcken am Filet.

In eigener Sache

Mit Beobachtungen von aufmerksamen Berufsfischern am Thunersee hat im Jahre 2000 alles angefangen. Beim Filetieren ihres täglichen Fangs fielen ihnen Felchen mit merkwürdig morphologisch veränderten Gonaden (Geschlechtsorganen) auf. Die genaue Ursache dieses Phänomens ist bis heute nicht bekannt. Im Wissen, dass der Schlüssel zur Lösung des Rätsels im Ökosystem Thunersee oder in genetischen Abklärungen zu finden sein dürfte, hat sich im Jahre 2004 die Zusammenarbeit zwischen David Bittner und Daniel Bernet ergeben. David, Doktorand unter der Leitung von PD Dr. Carlo Largiadèr in der Abteilung Populationsgenetik (CMPG) des Instituts für Ökologie und Evolution, brachte das Wissen zur Abklärung genetischer Aspekte mit (MICROCORE-Projekt). Daniel, Postdoc am Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin hatte die Expertise in Fischkrankheiten und Epidemiologie. Mit gemeinsamen und eigenen Abklärungen und Experimenten sind im Laufe der Jahre mehrere Publikationen und Manuskripte entstanden. Im Wissen um das weitreichende öffentliche Interesse und die gesellschaftlichen Ängste zum Thema „Gonadenveränderungen Thunerseefelchen“ (Genusstauglichkeit der Fische, Trinkwasserrelevanz, Badeverbot, etc.), haben wir uns entschlossen, die mehrjährige interdisziplinäre Arbeit gemeinsam beim Berner Umwelt-Forschungspreis 2009/10 einzureichen. Wir reichen für die Bewerbung unsere wissenschaftlichen Manuskripte ein, und zur Beschreibung des Umwelt-Phänomens „Gonadenveränderungen Thunerseefelchen“ eine deutsche zusammenfassende Version.

*Selbstverständlich waren in den vergangenen Jahren seit der Entdeckung der Veränderungen – wegen der Komplexität und Vielschichtigkeit der Anforderungen zur Problemlösung – die Expertisen zahlreicher anderer Institutionen und Personen notwendig. Wir möchten es nicht unterlassen, in der vorliegenden Kurzform auch die wichtigsten Erkenntnisse dieser Untersuchungen zu erwähnen, kennzeichnen jedoch unsere eigenen Manuskripte, indem wir sie in Kapitälchen und Fettschrift formatieren, z.B. **[BERNET ET AL., 2009]**.*

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Berufsfischer am Thunersee machen eine Entdeckung	3
3	Eine breite Trägerschaft und inter- wie transdisziplinäre Zusammenarbeit	4
4	Epidemiologische Abklärungen.....	6
5	Spezialfall Thunersee	7
6	Mögliche Ursachen	10
7	Ursachenabklärungen.....	12
7.1	Hormonaktive oder andere Stoffe im Ökosystem Thunersee?.....	12
7.2	Genetische und Genexpressions-Studien	15
8	Schlussfolgerungen	20
9	Dank.....	21
10	Referenzen.....	24
11	Beigelegte eigene Manuskripte	26
11.1	Publiziert.....	26
11.2	Akzeptiert.....	26
11.3	Eingereicht oder vor Submission	26

1 Zusammenfassung

Im Jahr 2000 fielen Berufsfischern vom Thunersee vermehrt Felchen (*Coregonus lavaretus*) mit morphologisch veränderten Gonaden auf. Die Ursachen für die Veränderungen lagen völlig im Dunkeln. Das Phänomen war von grossem öffentlichen Interesse und wurde von zahlreichen Medien aufgegriffen. Es erschienen Beiträge in nationalen und internationalen Medien über das „Rätsel vom Thunersee“. Das Bekanntwerden von Munitionsversenkungen im Thunersee durch die Schweizer Armee und Emissionen von Bauchemikalien vom NEAT Tunnelbau am Lötschberg gaben Nahrung für Spekulationen um mögliche Zusammenhänge zwischen Umweltchemikalien und den Gonadendeformationen. Aufbereitetes Thunerseewasser dient über 400'000 Personen als Trinkwasser. Der See ist von grossem ökonomischem Wert für die Wirtschaftszweige Tourismus, Fischerei und Schifffahrt. Die ganze Region wird von der Seenlandschaft geprägt. Vor diesem Hintergrund ist verständlich, dass das mögliche Auftreten Keimbahn-schädigender Stoffe im See zu Besorgnis führte. Die Ungewissheit löste Ängste in der Bevölkerung aus. Darf man das Wasser noch trinken? Kann man die Fische noch essen? Darf man noch baden im Thunersee? Das Phänomen erlangte gesellschaftliche Relevanz und politische Brisanz. Die Wissenschaft war gefordert, Grundlagendaten zu erheben und die Behörden waren in der Pflicht, geeignete Massnahmen zu ergreifen und regelmässig zu informieren.

Aus diesen Gründen wurde im Jahr 2003 eine Arbeitsgruppe zur Koordination der nötigen Abklärungen und zum interdisziplinären Erfahrungsaustausch gegründet. Wissenschaftler, Behörden, Berufsfischer und Sportangler nahmen Einsitz im Gremium. Über 20 Teilprojekte wurden initiiert. Diese können samt Ergebnissen im Schlussbericht des Fischereiinspektorats des Kantons Bern zum Regierungsratsbeschluss eingesehen werden (Fischereiinspektorat 2008). Die Expertise der Institute der beiden Autoren lag in der Beschreibung des Phänomens (**BERNET ET AL., 2004**), in epidemiologischen Abklärungen (**BITTNER ET AL., 2009**), und in der Bewertung von hormonaktiven Stoffen (**BERNET ET AL., 2008; KIPFER ET AL., 2009**), in einer möglichen rezenten Hybridisierung zwischen genetisch verschiedenen Felchenpopulationen und in Inzuchteffekten (**BITTNER, UNPUBLIZIERT**) als Ursache der Gonadenveränderungen. Es wurden Grundlagendaten zur ontogenetischen Entwicklung der Felchengonaden erhoben (**BERNET ET AL., EINGEREICHT**), die Faktoren „Wasser“, „Sediment“ und „Nahrung“ (**BERNET ET AL., IN VORB.**), sowie mögliche Kandidatengene und physiologische Stoffwechselwege in Zusammenhang mit den Gonadenveränderungen untersucht (**BITTNER ET AL., IN VORB. A**)

In einer ersten Untersuchung von Felchen aus dem Thunersee wurden sechs verschiedene Typen von Veränderungen beschrieben: Verwachsungen der Gonaden mit dem Bauchfell und der seitlichen Muskulatur, Asymmetrie der Gonadenlänge, Atrophie/Aplasie der Gonadenstränge, Kompartimentierungen in mehrere Loben, Einschnürungen und Zwitterbildungen. Die Veränderungen waren in ihrer Häufigkeit und Ausprägung im Thunersee einzigartig (**BERNET ET AL., 2004**). Diese Untersuchung ergab, dass 35% einer repräsentativen Stichprobe von Felchen aus dem Thunersee Veränderungen der Geschlechtsorgane zeigten (**BERNET ET AL., 2004**). Sowohl das Geschlecht der Fische, als auch das Alter und die Felchenform hatten entscheidenden Einfluss auf die Häufigkeit der vorgefundenen Veränderungen. Eine zweite intensivierte Untersuchung von nahezu 5000 Felchen aus dem Thunersee und seinen Nachbarseen Briener- und Bielersee zeigte, dass

Gonadenveränderungen auch in anderen Seen gefunden wurden (**BITTNER ET AL., 2009**). Allerdings umfassten diese Veränderungen vorwiegend asymmetrische Gonadenstränge und Konstriktionen. Kompartimentierungen, Verwachsungen, Aplasien/Atrophien und Zwitterbildungen hingegen waren in Bieler- und Brienersee selten oder inexistent, im Thunersee jedoch signifikant häufiger. Diese Ergebnisse deuteten an, dass das Problem „Gonadenveränderungen bei Thunersee-Felchen“ komplexer ist als ursprünglich angenommen. Einerseits gibt es eine natürlicherweise vorhandene Variabilität der Gonadenmorphologie bei Felchen in allen Seen (in Form von Asymmetrien und Konstriktionen), die in dieser Form nicht bekannt war, andererseits kommen speziell im Thunersee Verwachsungen, Kompartimentierungen, Aplasien/Atrophien und Zwitter-Tiere bei den Felchen signifikant häufiger vor. Eine zentrale Schlussfolgerung aus dieser Studie besagt, nur noch bei Verwachsungen, Kompartimentierungen, Aplasien/Atrophien und Zwitter-Tieren von Gonadenveränderungen zu sprechen (**BITTNER ET AL., 2009**). Die Ergebnisse dieser umfassenden Untersuchung führten zu einem differenzierteren Bild des Phänomens „Gonadenveränderungen bei Felchen“, und bestätigten gleichzeitig die Einzigartigkeit des Thunersees. Dieses Ergebnis macht deutlich, wie wichtig ausreichende Grundlagen-Daten sind, Umweltprobleme korrekt bewerten zu können.

Parallel zu den epidemiologischen Untersuchungen wurde der Frage nach möglichen Ursachen für das gehäufte Auftreten von Gonadenveränderungen nachgegangen. Neben umweltbedingten Einflüssen wurden auch genetische Faktoren als Ursachen in Erwägung gezogen. Potenzielle Schadstoffquellen im Thunersee sind die in den Jahren 1920 bis 1963 versenkten 4'600 Tonnen Munitionsabfälle der Schweizer Armee und die Abwasserbelastung durch die Bautätigkeit am Lötschberg-Tunnel. Die Ursachenfindung gestaltete sich sprichwörtlich als „Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen“. Nach manchen übertriebenen Darstellungen in den Medien konnten wir mit unseren wissenschaftlichen Arbeiten zu einer Versachlichung der Diskussion beitragen. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Gonadenveränderungen nicht in Zusammenhang mit hormonaktiven Substanzen stehen (**BERNET ET AL., 2008; KIPFER ET AL., 2009**) und keine Folge von Hybridisierungs- oder Inzuchteffekten zwischen den Felchenformen darstellen (**BITTNER, UNPUBLIZIERT**). Zusätzlich konnten eine Vererbung der Veränderungen (**BERNET ET AL., IN VORB.**) und eine unsachgemässe Aufzucht der Felchen in der Fischzucht (**BERNET ET AL., 2004**) als Ursachen ausgeschlossen werden. Es wurden wegweisende Erkenntnisse erlangt, dass das Zooplankton im Thunersee die Gonadenveränderungen auslöst (**BERNET ET AL., IN VORB.**). Durch die Anwendung von hochmodernen Microarrays wurde bei deformierten Felchen eine Disregulation des Immunsystems festgestellt (**BITTNER ET AL., IN VORB. A**). Dies liefert Hinweise darauf, dass die deformierten Fische unter zusätzlichem Stress stehen. Die Daten führten zu einer neuen Hypothese einer chronischen Autoimmunkrankheit der Fische, ausgelöst durch eine Kontamination des Zooplanktons mit xenobiotischen Substanzen (**BITTNER ET AL., IN VORB. A**).

Das Rätsel vom Thunersee ist noch nicht gelöst. Das Spektrum potenzieller Ursachen wurde durch unsere Untersuchungen jedoch stark eingeeengt, wodurch die Richtung zukünftiger Abklärungen etabliert wurde. Mit unseren gleichermassen inter- wie transdisziplinären Arbeiten ist es gelungen, der Untersuchung des gesellschaftlich wichtigen Umweltphänomens am Thunersee entscheidende Impulse zu liefern und zu einem besseren Verständnis beizutragen. Einige der von uns aufgeworfenen Fragestellungen sind bereits Gegenstand aktueller Untersuchungen.

2 Berufsfischer am Thunersee machen eine Entdeckung

Im Jahr 2000, beim Filetieren ihrer Tagesfänge, fielen mehreren Berufsfischern am Thunersee erstmals Felchen auf, bei denen Teile der Geschlechtsorgane knotenartig im Filet eingewachsen waren, oder die sowohl Hoden als auch Eierstöcke hatten, also Zwitter waren. Auf Grund dieser Beobachtungen hat das Fischereiinspektorat des Kantons Bern das Zentrum für Fisch und Wildtiermedizin (FIWI) am Tierspital Bern beauftragt, die Fische pathologisch zu untersuchen. Daraus ist 2004 eine erste Publikation entstanden, welche die Gonadenveränderungen bei den Thunerseefelchen beschreibt (**BERNET ET AL., 2004**).

Die Geschlechtsorgane der Felchen sind paarig angeordnet und befinden sich als langgestreckte Organe, ventro-lateral der Schwimmblase angelagert, dorsal in der Bauchhöhle. Abweichend von dieser Gonadenmorphologie wurden sechs Typen von Veränderungen beschrieben (Tab.1, Abb. 1). Zur zusätzlichen Veranschaulichung dienen die Abbildungen auf der Titelseite.

Tab.1: Typen von Gonadenveränderungen bei Felchen aus dem Thunersee. Sie wurden als Abweichung von der „normalen“ morphologischen Entwicklung der Gonaden beschrieben.

Veränderungstyp	Beschreibung
Hermaphroditismus (Mischgonade, Intersex) (Abb. 1a)	Drei verschiedene Formen: A. <u>Lobuläre Mischgonade</u> : Auf demselben Gonadenstrang wechseln sich ovarielles Gewebe und Hodengewebe in konsekutiver Abfolge ab. B. <u>sexuell unterschied. Gonadenstränge</u> : Der eine ist Ovar, der andere Hoden. C. <u>Ovotestis</u> (einzelne Oozyten befinden sich im Hodengewebe) oder <u>Testis-Ova</u> (Entwicklungsstadien der Spermiogenese treten im ovariellen Gewebe auf). Nur histologisch diagnostizierbar.
Verwachsungen (Abb. 1b)	Teile der Gonaden sind mit dem Peritoneum oder der seitlichen Muskulatur verwachsen. Die Verwachsungen sind teilweise soweit fortgeschritten, dass der betroffene Gonadenteil vollständig mit Bindegewebe umschlossen und so makroskopisch als Einwuchs in die seitliche Muskulatur wahrgenommen wird.
Kompartimentierung (Abb. 1c)	Gonadenstränge bestehen aus mehreren Teilen (Loben) und sind miteinander durch nadeldünne Samenleiter (bei Männchen) oder durch die Ovarialhülle (bei Weibchen) verbunden. Während eine Kompartimentierung des Hodenstranges in ein vorderes (kraniales) Hauptstück und einen hinteren (kaudalen) kleineren Hodenteil auch von anderen Autoren beschrieben (z.B. Meder, 1984) und als "normales" Bild gewertet wird, gehen die Beobachtungen an den Felchen aus dem Thunersee über dieses Bild hinaus. Bei vielen Männchen waren die Gonadenstränge in mehr als 2 Teile unterteilt.
Konstriktion (Abb. 1d)	Konstriktionen sind Einschnürungen im Gonadenstrang, also Bereiche, in denen die Entwicklung des Gonadengewebes lokal begrenzt nicht funktioniert hat. Im Gegensatz zu den Kompartimentierungen sind die Loben jedoch nicht räumlich voneinander getrennt und durch Samenleiter oder Ovarialhülle verbunden, sondern liegen einander an.
Asymmetrie (Abb. 1e)	Als asymmetrisch werden Gonaden bezeichnet, bei denen sich der eine Strang in Gewicht, Volumen oder Länge um mehr als 50% vom anderen Strang unterscheidet.
Atrophie / Aplasie (Abb. 1f)	Ein Gonadenstrang oder auch beide ist/sind zwar angelegt und erkennbar, jedoch nicht entwickelt (Atrophie). Einseitig oder beidseitig vollständiges Fehlen der Gonadenstränge (Aplasie).

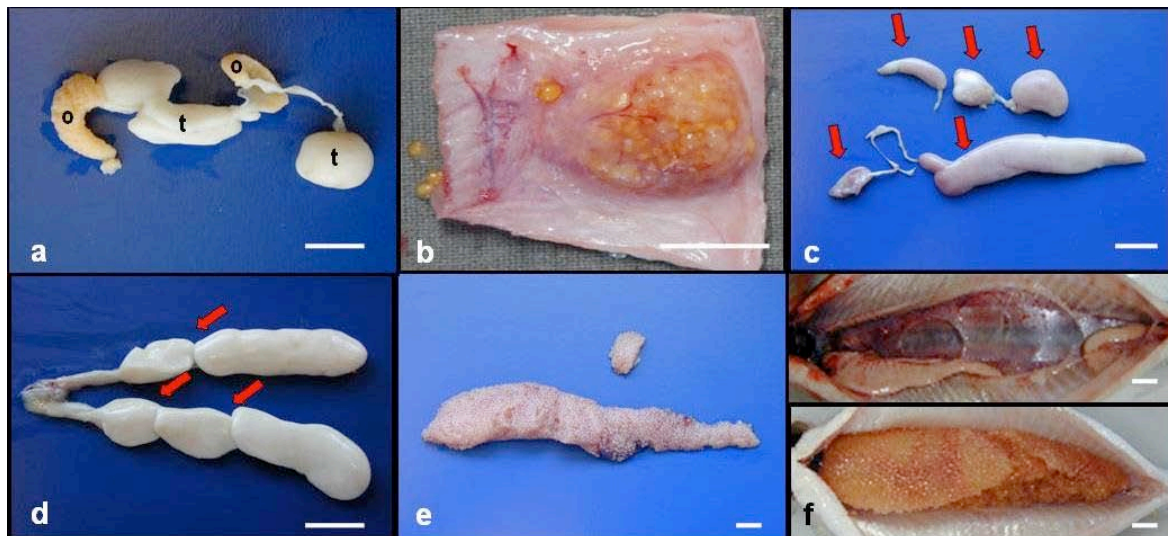


Abb.1: Gonadenveränderungen bei Felchen aus dem Thunersee. **a)** Zwitter: Ovarielles Gewebe (O) und Hodengewebe (H) befinden sich auf demselben Strang. **b)** Verwachsungen: eingewachsenes Ovarienpaket in der Muskulatur. **c)** Kompartimentierte Hoden: Die Hodenstränge sind unterteilt in mehrere Loben (rote Pfeile), die durch den Hodenstrang miteinander verbunden sind. **d)** Konstriktionen: Die Hodenstränge sind eingeschnürt. Die entstandenen Loben sind jedoch nicht räumlich von einander getrennt. **e)** Asymmetrische Ovarien. **f)** Fehlen des einen Gonadenstrangs (Aplasie). Oben: Bei einem Männchen fehlt der linke Hoden. Unten: Bei einem Weibchen ist nur das linke Ovar vorhanden. Abbildung aus **BERNET ET AL., 2008**.

3 Eine breite Trägerschaft und inter- wie transdisziplinäre Zusammenarbeit

Die Gonadenveränderungen bei den Felchen im Thunersee sind landesweit auf grosses öffentliches Interesse gestossen. Zeitungen, Radio und Fernsehen berichteten in vielen Beiträgen über das Phänomen am Thunersee. Die einzigartigen, bislang unerklärlichen Veränderungen schürten Ängste in der Bevölkerung. Niemand kannte die Ursachen für diese Deformationen. Der Thunersee dient als Trinkwasserspeicher für über 400'000 Menschen. Die Berufsfischer verkaufen jedes Jahr zwischen 20-50 Tonnen Felchen in der Region. Der Felchen ist auch ein äusserst geschätzter Sportfisch und die Thunersee-Region ist eine beliebte Feriendestination von nationaler und internationaler Bedeutung. Fragen wurden aufgeworfen: Ist der Thunersee mit einer schädlichen Substanz belastet? Etwa mit hormonaktiven Stoffen? Kann man die Fische noch essen? Kann man das Wasser noch trinken? Und was ist mit dem Baden?

Ein Zusammenhang der Gonadenveränderungen mit Wasserinhaltsstoffen hätte direkte Konsequenzen für die Trinkwasseraufbereitung, die Genussstauglichkeit der Felchen sowie für die Existenz der lokalen Berufsfischer. Das Phänomen am Thunersee geht weit über ein rein akademisches Problem hinaus. Es hat eine grosse gesellschaftliche Relevanz. Es

besteht ein substantielles öffentliches Interesse, die Ursachen für die Gonadenveränderungen zu kennen, potenzielle Verschmutzerquellen zu suchen und allenfalls zu eliminieren.

Als kurz nach der ersten Beobachtung von veränderten Felchen publik wurde, dass die Schweizer Armee in den 20er bis 60er Jahren Tonnagen von obsoleter Munition im Thunersee entsorgte (siehe Kapitel 6), war die Verunsicherung perfekt. Der Thunersee wurde zum Thema der Politik. In einer parlamentarischen Motion wurde sogar verlangt, die Munition zu bergen. Der Bundesrat musste sich erklären. Machbarkeitsstudien und Risikoabschätzungen zur Bergung der Munition wurden gemacht. Noch fehlten konkrete Zusammenhänge zwischen der Munitionsdeponie auf dem Seegrund und den Gonadenveränderungen. Ähnlich war die Situation mit der Tunnelbaustelle am Lötschberg. In den Abwässern der Baustelle, die über die Kander in den Thunersee fliessen, vermutete man diverse Rückstände von Bauchemikalien. Der Bedarf an Untersuchungsergebnissen stieg erheblich an.

Schon bald wurde klar, dass die Bevölkerung regelmässig über den aktuellen Stand der Untersuchungen informiert werden musste. Entscheidungen über die Art und Weise des Vorgehens bei den Untersuchungen mussten breit abgestützt sein. Daher wurde eine Arbeitsgruppe gebildet, die aus Vertretern der Volkswirtschaftsdirektion des Kantons Bern (Fischereiinspektorat und Veterinäramt), der Bau-, Verkehrs- und Energiewirtschaftsdirektion des Kantons Bern (Gewässer- und Bodenschutzlabor; Bern), der Gesundheits- und Fürsorgedirektion des Kantons Bern (Kantonales Laboratorium, Bern), dem Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, dem Institut für Ökologie und Evolution der Universität Bern, dem Institut für Klinische Chemie des Inselspitals, dem Eidgenössischen Departement für Verteidigung, Bevölkerungsschutz und Sport, dem Bundesamt für Umwelt, dem Bernischen Berufsfischerverband und dem Bernisch Kantonalen Fischereiverband zusammengesetzt war.

Bei den wissenschaftlichen Untersuchungen waren und sind mehrere eidgenössische (EMPA, ETH, VBS), universitäre (Institut für Ökologie und Evolution, Bern; Institut für Klinische Chemie, Bern; Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Bern; Department of Ecology and Evolution, Lausanne), kantonale (Fischereiinspektorat, Veterinäramt, Gewässer- und Bodenschutzlabor, kantonales Laboratorium Bern; Amt für Umweltschutz Uri; Service de la faune Neuchâtel; Amt für Wald, Wild und Fischerei, Fribourg; Centre de la conservation de la faune et de la nature, St. Sulpice) und private Fachstellen (Aquasana, Ulmiz) beteiligt. Häufig wurden Fragestellungen inter- und transdisziplinär angegangen und bearbeitet. Das Fischereiinspektorat Bern hat als Schlussbericht zum Regierungsratsbeschluss von 2003 alle wissenschaftlichen Teilprojekte und die wichtigsten

Fakten zum Thema „Gonadenveränderungen Thunerseefelchen“ in einer Sammelmappe publiziert (Fischereiinspektorat des Kantons Bern, 2008).

Finanziert wurden die Projekte durch das Fischereiinspektorat Bern (Regierungsratbeschluss vom Mai 2003 zur Abschätzung der Ursachen der Gonadenveränderungen und der Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit), den Schweizerischen Nationalfond (im Rahmen des Nationalen Forschungsprogramms 50 „Endocrine Disruptors“), das Bundesamt für Umwelt, sowie durch Eigenleistungen der verschiedenen involvierten Institutionen.

4 Epidemiologische Abklärungen

Zu Beginn des Projekts war es nicht einfach, die Bedeutung der Veränderungen nach den ersten Untersuchungen zur Charakterisierung der Gonadenmorphologie (**BERNET ET AL., 2004**) richtig einzuschätzen. Wichtige Basisdaten fehlten: Kommen ähnliche Veränderungen auch in Felchen von anderen Seen oder auch bei anderen Fischarten vor? Stellen wirklich alle der beschriebenen Veränderungstypen Abweichungen von einer allenfalls „normalen“ Variabilität der Gonadenmorphologie dar? Eine Literatur-Recherche und eine Umfrage bei nationalen und internationalen Felchen-Experten ergaben, dass die Situation am Thunersee einzigartig ist (Escher, 2001). Was aus diesen Abklärungen deutlich wurde war, dass es zur korrekten Einschätzung der Situation am Thunersee epidemiologische Grundlegendaten zur Häufigkeit und Verbreitung der Gonadenveränderungen in verschiedenen Schweizer Seen brauchte (**BITTNER ET AL., 2009**).

Für die Erhebung dieser Daten wurden zwei unabhängige Überwachungsprogramme initiiert. Eines davon sollte die Formenvielfalt der verschiedenen Felchenpopulationen berücksichtigen. Im Thunersee leben sowohl genetisch wie ökologisch differenzierte Felchenformen, die sich aufgrund ihrer Lebensweise (z.B. Nahrung, Laichzeit, Laichtiefe) unterschiedlich in das Ökosystem eingemischt haben. Anhand der Laichplatzbeprobungen (siehe unten) konnten die verschiedenen Felchenformen sowohl genetisch wie ökologisch charakterisiert werden (siehe Abb. 6; **BITTNER ET AL., IN VORB.B**). Die beiden Ansätze ergänzten sich gegenseitig. Sie werden nachfolgend kurz beschreiben:

- Monatsmonitoring der Berufsfischerfänge: Seit dem Jahr 2001 werden jeden Monat vom Fischereiinspektorat Bern die Gonaden von 25 Felchen aus den Fängen der Berufsfischer morphologisch beurteilt. Die aus dem Monatsmonitoring erhaltene Stichprobe repräsentiert die Häufigkeit der Gonadendeformationen in den Fängen der Berufsfischer. Diese Fänge können aus mehreren Felchenformen zusammengesetzt sein. Seit 2004 wurde dieses Monitoring auf den Brienersee und den Bielersee ausgedehnt. Die beiden Seen befinden sich im gleichen Gewässersystem wie der

Thunersee und sind miteinander durch den Fluss „Aare“ verbunden. Der Brienersee liegt 6 km oberhalb und der Bielersee 78 km unterhalb des Thunersees.

- Laichplatzmonitoring: Alle bekannten Laichplätze in den drei Berner Seen (Thunersee, Brienersee und Bielersee) wurden gezielt beprobt. Da sich die einzelnen Felchenformen entsprechend ihrer Präferenzen räumlich und zeitlich getrennt voneinander auf den Laichplätzen versammeln, ist es im Gegensatz zum Monatsmonitoring möglich, die einzelnen Formen gezielt zu befischen und folglich zu untersuchen. Die Beprobung von ca. 4'600 Felchen auf insgesamt 35 Laichplätzen in den drei Berner Seen bildet einen wichtigen Bestandteil der Dissertation von David Bittner. Um diese intensive Beprobung durchzuführen, waren die Wissenschaftler auf die Erfahrung und Mitarbeit aller lokaler Berufsfischer angewiesen. Diese symbiotische und enge Zusammenarbeit zwischen Akademikern und Praktikern steht stellvertretend für die Interdisziplinarität des ganzen Projektes.

5 Spezialfall Thunersee

Die mehrjährigen Überwachungsprogramme zeigten, dass im Thunersee signifikant mehr Felchen mit Gonadenveränderungen vorkommen als in den beiden anderen grossen Berner Seen (**BITTNER ET AL., 2009**). Erstaunlicherweise zeigten aber auch Felchen vom Briener- und Bielersee Veränderungen an den Geschlechtsorganen (Abb.2). Wir konnten zeigen, dass der Anteil der Gonadenveränderungen bei den Felchen in diesen Seen grossmehrheitlich Konstriktionen und Asymmetrien betrifft. Beide Veränderungstypen waren in allen drei Seen etwa gleich häufig (Abb.3). Hingegen waren Kompartimentierungen, Verwachsungen, Aplasien/Atrophien und Zwitter-Tiere bei den Felchen im Thunersee signifikant häufiger (Abb.3). Die Daten zeigen, dass wir es mit zwei unterschiedlichen Phänomenen zu tun haben: Einerseits mit einer natürlicherweise vorhandenen Variabilität der Gonadenmorphologie (Konstriktionen, Asymmetrien), und andererseits mit einer speziell im Thunersee vorliegenden induzierten Variabilität (Verwachsungen, Kompartimentierungen, Aplasien/Atrophie, Zwitter). Daher war eine der wichtigen Empfehlungen, bei zukünftigen Untersuchungen nur noch Kompartimentierungen, Verwachsungen, Aplasien/Atrophien und Zwitter als wirkliche Veränderungen zu bewerten (**BITTNER ET AL., 2009**).

Es wurde ein deutlicher Unterschied in der Häufigkeit der Veränderungen zwischen den beiden Geschlechtern, sowie eine Altersabhängigkeit erkannt (**BERNET ET AL., 2004; BITTNER ET AL., 2009**): Männchen waren signifikant häufiger betroffen als Weibchen. Gonadendeformationen traten bei allen Altersklassen auf, wurden jedoch am häufigsten bei den 3- bis 5-jährigen Tieren beobachtet, was auf dynamische Prozesse in der Gonadendeformationshäufigkeit hindeutet.

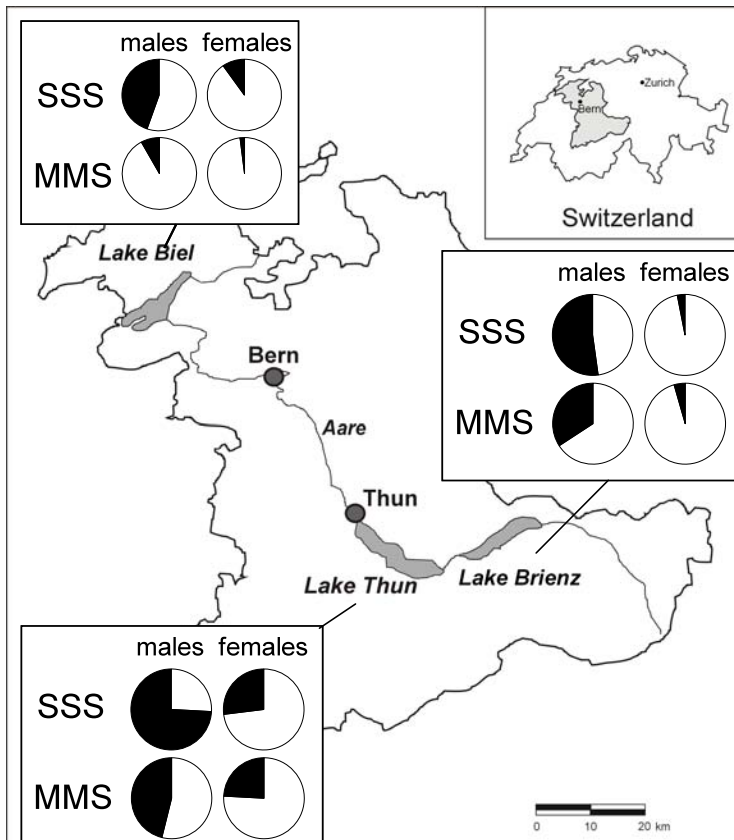


Abb.2: Häufigkeit der Gonadenveränderungen (schwarze Fläche) bei Männchen und Weibchen aus dem Monats- (MMS) und Laichplatzmonitoring (SSS) in den drei grossen Berner Seen. Aus **BITTNER ET AL. (2009)**.

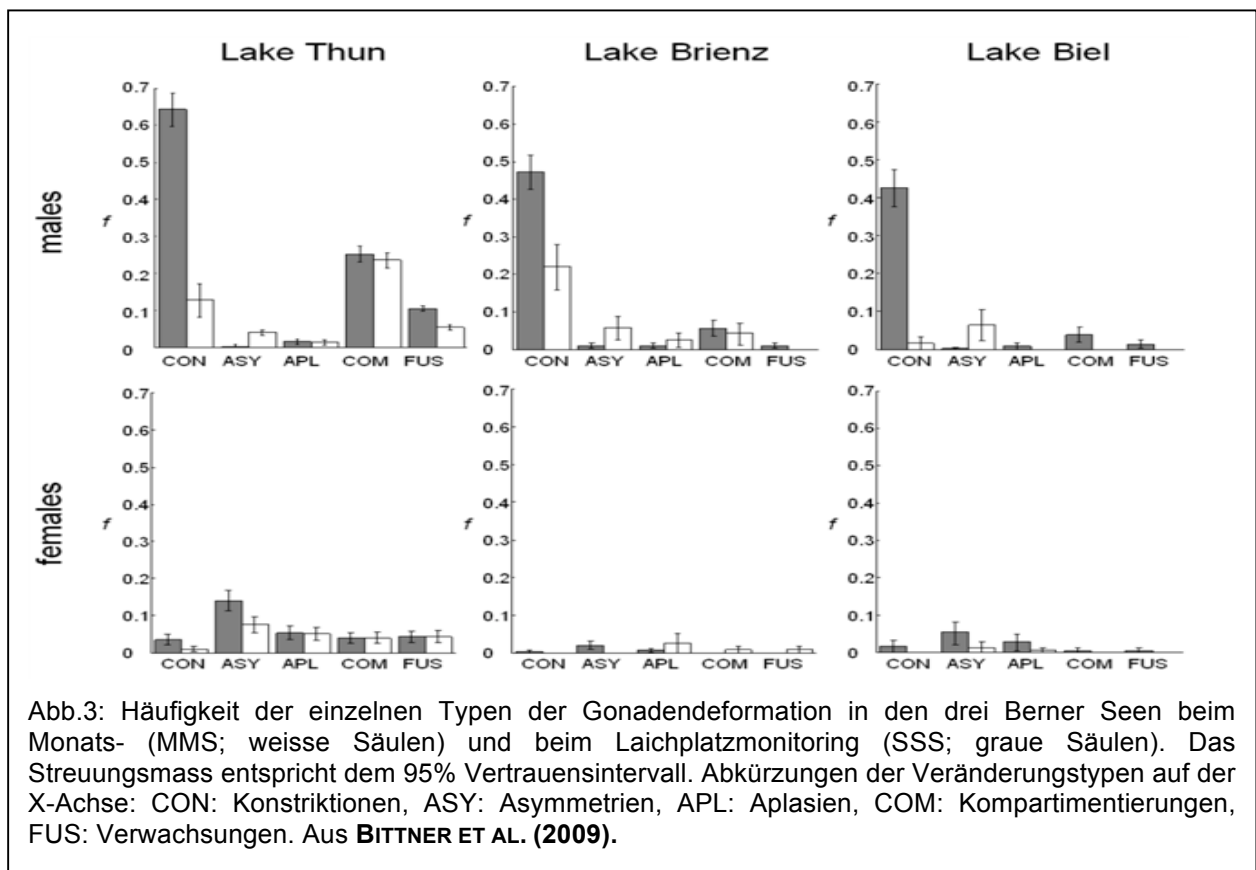


Abb.3: Häufigkeit der einzelnen Typen der Gonadendeformation in den drei Berner Seen beim Monats- (MMS; weisse Säulen) und beim Laichplatzmonitoring (SSS; graue Säulen). Das Streuungsmass entspricht dem 95% Vertrauensintervall. Abkürzungen der Veränderungstypen auf der X-Achse: CON: Konstriktionen, ASY: Asymmetrien, APL: Aplasien, COM: Kompartimentierungen, FUS: Verwachsungen. Aus **BITTNER ET AL. (2009)**.

Die Häufigkeit von Felchen mit Gonadenveränderungen war auf den einzelnen Laichplätzen sehr variabel. Es liess sich eine signifikante Abhängigkeit zwischen der Häufigkeit der Gonadenveränderungen und der Formzugehörigkeit nachweisen: Brienzlig und Kropfer sind mehr betroffen als Albock und Balchen (Abb.4; BITTNER ET AL., 2009).

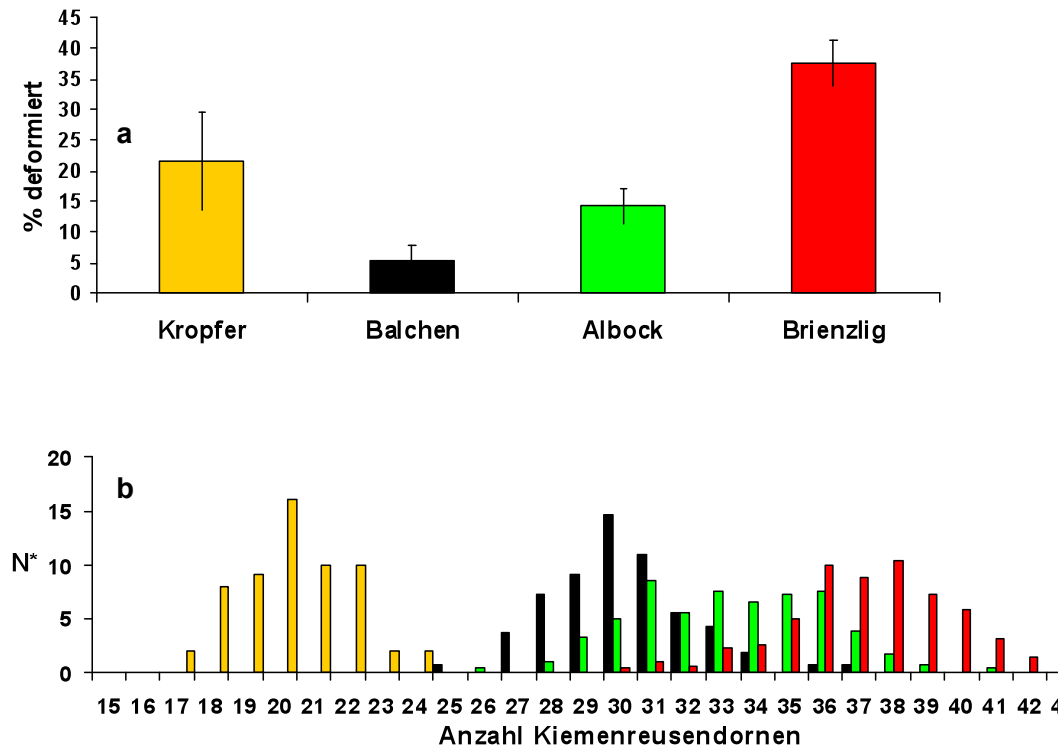


Abb. 4: a) Häufigkeit der Gonadenveränderungen bei den vier Felchenformen des Thunersees. Als deformiert wurden Geschlechtsorgane gewertet, wenn mindestens eine der folgenden Veränderungen vorkam: Kompartimentierung, Verwachsung, Aplasie/Atrophie und Zwitter. Das Streuungsmass ist das 95% Vertrauensintervall der Binomialverteilung. b) Frequenzverteilung der Anzahl Kiemenreusendornen bei den vier Felchenformen des Thunersees: Kropfer (gelb), Balchen (schwarz), Albock (grün) und Brienzlig (rot). N* bedeutet, dass der Stichprobenumfang bei allen Formen auf denjenigen der Form mit dem kleinsten N umgerechnet wurde.

Angesichts des hohen Anteils von Fischen mit veränderten Geschlechtsorganen liegt die Frage auf der Hand, ob die Fortpflanzung der Felchen im Thunersee noch möglich ist. Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand sind keine Hinweise vorhanden, dass die Fortpflanzung eingeschränkt wäre. Die Population der Felchen im Thunersee ist stabil. Fische mit veränderten Gonaden sind in der Lage, morphologisch intakte Spermien bzw. Eier anzubilden. Kontrollierte Befruchtungsexperimente in der Fischzucht gaben keine Hinweise, dass die Schlupfrate von Embryonen von Elterntieren mit Gonadenveränderungen reduziert wäre (Escher, 2002; Escher, 2004). Ebenso konnten bei der Beurteilung der Spermaqualität bei Milchneern (Motilität, Lebensdauer, Spermakrit, Spermienkonzentration) keine Einschränkungen festgestellt werden (Escher, 2002; Escher, 2004; Urbach et al., 2007).

6 Mögliche Ursachen

BERNET ET AL., 2004 haben kurz nach der Entdeckung der Gonadenveränderungen folgende Hypothesen zu möglichen Ursachen formuliert:

1) Infektiöse Fischkrankheiten

Deutliche Gonadenveränderungen und asynchrone Gonadenreifung wurden bei Rotaugen (*Rutilus rutilus*) im Baltischen Meer festgestellt. Diese traten in Zusammenhang mit Infektionen durch den einzelligen Parasiten *Pleistophora mirandellae* auf. Wir haben die Felchen im Thunersee auf das Vorhandensein von *Pleistophora mirandellae* untersucht, haben den Parasiten jedoch nie diagnostiziert (**BERNET ET AL., 2008**). Ebenso haben wir bei den untersuchten Felchen weder andere parasitäre, noch bakterielle oder virale Fischkrankheiten nachweisen können, die in Zusammenhang mit den Gonadenveränderungen stehen könnten. Somit werden infektiöse Erreger als Ursache als unwahrscheinlich eingeschätzt.

2) Auswirkungen des künstlichen Erbrütens der Felchen in der Fischzucht für Besatzmassnahmen

Die Felchenpopulationen im Thunersee werden jährlich mit Millionen von Brütlingen intensiv bewirtschaftet. Die Brütlinge werden durch künstliche Befruchtung von autochthonen Thunerseefelchen in der kantonalen Fischzucht erbrütet. Die Gonadenveränderungen könnten also Folge von ungewollten Manipulationen in der Fischzucht sein.

Diese Hypothese kann jedoch verworfen werden, weil nur die häufige Felchenform „Albock“ erbrütet und besetzt wird. Der ‚Albock‘ ist im Vergleich mit anderen Felchenformen signifikant weniger von Gonadenveränderungen betroffen (Abb.4). Der am stärksten betroffene „Brienzig“ wird im Gegensatz zum „Albock“ nicht besetzt.

3) Veränderungen der Wassertemperatur

Bei Fischen kann die Wassertemperatur Differenzierungsprozesse der Gonaden und deren Morphologie beeinflussen (Goto et al. 1999, Luksiene et al. 2000). Die Felchenlaichplätze im Thunersee liegen in der Regel in Tiefen von 30 bis 200 Metern und damit deutlich unterhalb der Sprungschicht. Es ist daher kaum mit signifikanten und noch weniger mit schnellen Temperatursprüngen zu rechnen. Die am stärksten betroffene Felchenform ‚Brienzig‘ verstärkt diese Folgerung, da der Brienzig in Tiefen von 100-200m laicht (**BITTNER ET AL., IN VORB.B**).

4) Umweltchemikalien im Ökosystem Thunersee

Es gibt eine Reihe von Feldstudien, die einen Zusammenhang zwischen Gonadenpathologien bei Fischen und Umweltkontaminanten nachwiesen. Bei Rotaugen (*Rutilus rutilus*) im Einflussbereich von Kläranlagen in Grossbritannien stieg der Anteil an Zwitter-Tieren durch endokrin-aktive Substanzen im Abwasser signifikant an (Rodgers-Gray et al. 2000). Phänotypisch männliche Flundern (*Platichthys flesus*) in britischen Ästuaren bildeten aufgrund von hormonaktiven Substanzen zwittrige Gonaden aus (Allen et al. 1999). Egli (*Perca fluviatilis*) eines PCB verseuchten Sees in Schweden entwickelten Gonadenanomalien (Forlin & Norrgren 1998). Wenngleich die beschriebenen Gonaden-Effekte dieser Studien nur bedingt mit den Gonadenpathologien der Felchen im Thunersee übereinstimmten, so besteht trotzdem die Möglichkeit, dass die Veränderungen der Thunersee-Felchen durch anthropogen eingebrachte Stoffe ausgelöst sind. Es bedurfte insbesondere gezielter Abklärungen zu hormonaktiven Stoffen als Ursache für die Gonadenveränderungen der Felchen. Bereits bei einer Vielzahl von Substanzen konnte eine hormonaktive Wirkung nachgewiesen werden. Die Folgen solcher Substanzen in der Umwelt können Probleme in der Gonadenentwicklung und in der Fortpflanzungsfähigkeit sein.

Potenzielle Schadstoffquellen im Thunersee sind versenkte TNT-haltige Munitionsabfälle der Schweizer Armee und eingeleitetes Abwasser beim NEAT-Tunnelbau am Lötschberg. In den Jahren 1920 bis 1963 versenkte die Schweizer Armee insgesamt ca. 4'600 Tonnen Munition im Thunersee. Die Entsorgungen fanden hauptsächlich an zwei Orten auf einer Fläche von je 1 km² an den tiefsten Stellen des Thunersees (217 m Wassertiefe) statt.

Die Bautätigkeit des 35 km langen Eisenbahntunnels Lötschberg wurde 1994 aufgenommen. Das Abwasser dieser Grossbaustelle wurde zuerst geklärt (einfache Filter- und Fällungsstufe) und anschliessend in den Fluss „Kander“ eingeleitet. Dieser mündet nach ca. 25 km in den Thunersee. Während der 12-jährigen Bautätigkeit wurden grosse Mengen an Stoffen eingesetzt, z.B. Strengstoffe für den Sprengvortrieb (v.a. Polyisobutene), Hilfsmittel im Spritzbeton (z.B. Naphtalinsulfonate) oder Flockungsmittel (v.a. Acrylamide) im Klärprozess der Abwasseraufbereitung.

5) Genetische Faktoren

Es gibt eine interessante Beobachtung von Gonadenveränderungen bei Felchen aus einem polnischen See (Demska-Zakes & Mamcarz 1996). Die Veränderungen der Fische in diesem See sind denjenigen der Felchen im Thunersee recht ähnlich. Die Ursachen der Gonadenveränderungen im polnischen See wurden einer Hybridisierung der

einheimischen Art *Coregonus lavaretus* mit der eingeführten sibirischen Art *C. peled* in Verbindung gebracht. Auch in den Grossen Seen Nordamerikas wurden bei Salmoniden Einschnürungen und Unterteilungen in den Gonaden beobachtet (Fitzsimons & Cairns 2000). Auch hier waren die Ursachen für die Veränderungen nicht klar. Die Autoren schlossen aber genetische Defekte im Erbgut der Fische als mögliche Ursachen nicht aus.

Die beiden letztgenannten Hypothesen erschienen unter Berücksichtigung der bestehenden Datenlage am plausibelsten. Sie wurden daher intensiv weiterverfolgt.

7 Ursachenabklärungen

Bei den Ursachenabklärungen der Gonadenveränderungen handelt es sich sprichwörtlich um eine „Suche nach der Nadel im Heuhaufen“. Alles war möglich, nichts jedoch gesichert. Intensive Forschungsarbeit wurde im Bereich von hormonaktiven Substanzen als Ursache der Veränderungen betrieben. Uns war jedoch seit Beginn der Untersuchungen klar, dass das Risiko von „Negativ-Ergebnissen“ hoch war, wenn ausschliesslich nach bestimmten Substanzen oder Substanzgruppen gesucht wurde. Daher war eines unserer primären Ziele, herauszufinden, ob das Ökosystem Thunersee mit den exogenen Faktoren ‚Wasser‘ und ‚Nahrung‘ oder aber der Fisch selber mit endogenen Faktoren Hinweise auf mögliche Ursachen liefert. Zur Abklärung endogener Faktoren wurden einerseits genetische Studien betreffend rezente Hybridisierung zwischen genetisch differenzierten Felchenformen und Inzuchteffekte durchgeführt, andererseits Genexpressions-Analysen von deformierten bzw. nicht deformierten Fischen. Mit dieser Herangehensweise erhofften wir uns, den Bereich eingrenzen zu können, in dem zukünftige Forschungen intensiviert werden sollten.

7.1 Hormonaktive oder andere Stoffe im Ökosystem Thunersee?

Das Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Bern ging der Frage nach, ob

- 1) die Gonadendeformationen in Zusammenhang mit hormonaktiven Substanzen stehen (Untersuchungen im Rahmen des Nationalen Schwerpunktprogramms NFP 50 des Schweizerischen Nationalfond), und ob
- 2) die Gonadendeformationen durch Inhaltsstoffe im Ökosystem Thunersee (Wasser, Sediment, Plankton) verursacht werden.

Östrogenaktive Substanzen im Ökosystem des Thunersee als Ursache für die Gonadenveränderungen erscheinen nach heutigen Erkenntnisse unwahrscheinlich (**BERNET ET AL., 2008**). Felchen vom Thunersee wurden während den Jahren 2005 und 2006 auf

Biomarker für endokrine Disruption untersucht, nämlich Vitellogenin (VTG)-Produktion bei Männchen, Geschlechtshormone (Testosteron und 11-Keto-Testosteron) und Intersex Häufigkeit. Felchen mit Gonadenveränderungen unterschieden sich weder in der VTG Konzentration noch im Steroidgehalt von Individuen ohne Gonadenveränderungen (**BERNET ET AL., 2008**). Die Häufigkeit von zwittrigen Gonaden war tief, mit Ausnahme eines Standorts, an welchem eine hohe Prävalenz von bis zu 15% festgestellt wurde. Die Gründe dafür sind nicht bekannt. Bei der VTG Konzentration und der Steroidkonzentration war dieser Standort nicht auffällig.

Bei einem mehrjährigen experimentellen Versuch von 2004 bis 2007 wurden Felchen vom Schlupf bis zur Geschlechtsreife in Trinkwasser aufgezogen und mit kommerziellem Trockenfutter gefüttert, dem Östrogen (17 β -Östradiol) beigemischt wurde. Es gab drei Gruppen: eine Kontroll-Gruppe, eine niedrige (0.5 ug/kg Fisch/Tag) und eine hohe Östrogen-Dosis Gruppe (50 ug/kg Fisch/Tag). Die Hypothese war, dass die Gonadenveränderungen mit der eigentlichen „Muttersubstanz“, dem Östrogen, induziert werden könnten, falls die Gonadenveränderungen durch hormonaktive Substanzen verursacht würden, und die Toxizität über den endokrinen Wirkmechanismus laufen sollte. Der Versuch zeigte deutlich, dass das Verfüttern von 17 β -Östradiol - haltiger Nahrung zwar zu Veränderungen führt, die typisch für Östrogene sind (Erhöhung der Intersex Häufigkeit, Reduktion des Gonaden- und Körperwachstums, Verlangsamung der Gonadenreife, Verschiebung des Geschlechterverhältnisses hin zu mehr Weibchen). Die Thunersee-typischen Gonadenveränderungen hingegen liessen jedoch sich nicht induzieren (**KIPFER ET AL., 2009**).

Wie bei den Kenntnissen zu den Ursachen der Veränderungen, fehlten grundlegende Daten zur Entstehung der Gonadenveränderungen. Es war beispielsweise unklar, ob sich die Gonadenveränderungen während des Differenzierungsprozesses der Gonaden bei den juvenilen Felchen ausprägen, oder ob sie sich erst bei den adulten Tieren entwickeln, wenn die Gonade schon differenziert ist. Hierfür haben wir Felchen vom Schlupf bis zum Erreichen der Geschlechtsreife aufgezogen. Die Ziele waren, einerseits den vollständigen ontogenetischen Entwicklungsprozess der Felchengonade erstmalig zu beschreiben, und andererseits zu erkennen, wann die ersten Gonadenveränderungen in der Entwicklung des Fisches auftreten (**BERNET ET AL., EINGEREICHT**). Die ersten Gonadenanlagen waren bei den Brütlingen ab 65 Tage nach Schlupf erkennbar. Weibchen differenzierten deutlich früher als Männchen (w: ab 150 Tage nach Schlupf; m: ab 260 Tage nach Schlupf). Ca. 10% der Tiere sind kurz vor Vollendung des 2. Lebensjahres (680 Tage) teilreif, d.h. es werden bereits einige reife Eier oder Spermien abgegeben. Der überwiegende Anteil der Follikel / Tubuli gelangt jedoch erst im nächsten Jahr zur Reife (ca. 900 Tage). Bereits während der Gonadenentwicklung (> 170 Tage nach Schlupf) treten Gonadenveränderungen (Zwitter,

Kompartimentierungen, Konstriktionen, Asymmetrien, Atrophien) auf. Es wurde ein hoher Anteil von 8-9% zwitterigen Fischen während des Differenzierungsprozesses festgestellt. Weil keine Hinweise auf eine endokrine Disruption vorlag (keine Erhöhung der Vitellogenin-Konzentration; hohe Prävalenzen auch in der Felchengruppe, die in Quellwasser aufgezogen wurde) gehen wir davon aus, dass es sich dabei um eine natürliche, transient erhöhte Zwitterhäufigkeit während des ontogenetischen Differenzierungsprozesses bei Jungfelchen handelt, die sich jedoch im adulten Tier „auswächst“.

In einem dritten Versuch wollten wir die Faktoren „Wasser“, „Nahrung“ und „genetische Herkunft der Fische“ als auslösende Faktoren für die Gonadenveränderungen überprüfen. Dazu haben wir in einem Expositionsexperiment in den Jahren 2004 bis 2008, mit zwei unabhängigen Ansätzen über je drei Jahre, Fische vom Thuner- und vom Bielersee künstlich erbrütet, die Nachkommen bis zum Erreichen der Geschlechtsreife in unterschiedlicher Wasserqualität (Thunerseewasser, Vierwaldstätterseewasser oder Quellwasser) aufgezogen und die Fische mit unterschiedlichem Futter gefüttert (Zooplankton vom Thunersee oder kommerzielles Trockenfutter; **BERNET ET AL., IN VORB.**). Die Resultate waren deutlich und - was von besonderer Bedeutung ist - reproduzierbar. Fische, die mit Zooplankton gefüttert wurden entwickelten die Thunersee-typischen Gonadendeformationen (13-27% der Männchen und 2-13% der Weibchen). Unabhängig davon, in welcher Wasserqualität die Fische aufgezogen wurden und unabhängig davon ob es sich um Nachkommen von Thuner- oder Bielerseefelchen handelte. Fische, die mit kommerziellem Trockenfutter aufgezogen wurden zeigten signifikant weniger Gonadenveränderungen (Männchen: 2-8%; Weibchen: 0-3%). Damit konnte klar gezeigt werden, dass das Zooplankton auslösendes Potenzial hat und eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Gonadenveränderung spielt. Dieses Ergebnis könnte auch die Erklärung dafür sein, wieso die Häufigkeit der Gonadenveränderungen bei den einzelnen Felchenformen im Thunersee signifikant unterschiedlich ist. Die einzelnen Felchenformen haben unterschiedliche Nahrungspräferenzen. Das Thunerseewasser stand nicht in Zusammenhang mit den Gonadenveränderungen, wohl aber die Nahrung. Und diese unterscheidet sich, anders als die Wasserkonditionen, zwischen den Felchenformen. Die Resultate aus diesem Experiment bedeuten einen Meilenstein in der Erforschung der Gonadenveränderungen und ermutigen zur Weiterführung zukünftiger Abklärungen.

Bei einem vierten und letzten Experiment während den Jahren 2005 bis 2008 wurde der Frage nachgegangen, ob (a) das Sediment im Thunersee auslösendes Potenzial hat und (b) Rückstände im Sediment durch die Munitionsversenkungen der Armee (Sprengstoffe) oder durch den NEAT Tunnelbau (Bauchemikalien) in Zusammenhang mit den Gonadenveränderungen stehen. Felcheneier liegen während ihrer Entwicklung auf dem

Seegrund. In dieser Zeit haben sie direkten Kontakt mit dem Seesediment und sind so während einer sensiblen Entwicklungsphase Substanzen im Sediment ausgesetzt. Um diese Situation zu simulieren haben wir eine neue Erbrütungstechnik (ein horizontales rezirkuläres Erbrütungssystem) entwickeln müssen, mit der wir Felcheneier im Labor unter standardisierten Bedingungen Seesediment exponieren konnten. Zudem wurden Felcheneier auf Sediment erbrütet, dem Sprengstoff (TNT) oder Bauchemikalien-Substanzen (Naphtalinsulfonat-Polykondensat [NSFK], Weichmacher im Spritzbeton) beigemischt wurden. Nach dem Schlupf wurden die Felchen in Trinkwasser bis zum Erreichen der Geschlechtsreife aufgezogen und mit kommerziellem Trockenfutter gefüttert. Die Schlussprobenahme fand im November 2008 statt. Die Daten sind ausgewertet aber das Manuskript noch nicht geschrieben. Weder Felchen die als Eier auf Thunerseesediment aufgezogen wurden, noch Felchen die in der Eiphasse TNT oder NSFK exponiert worden waren, wurden Gonadenveränderungen nachgewiesen. Unter den gewählten Bedingungen (ausgewählte Stoffgruppen; Dauer der Exposition; Konzentrationen der Stoffe) gibt es keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Seesediment, TNT, NSFK und den beobachteten Gonadenveränderungen im Thunersee.

7.2 Genetische und Genexpressions-Studien

Im Gegensatz zu Untersuchungen, welche gezielt bestimmte exogene Stoffe als potentielle Ursachen der Gonadenveränderungen abklärten, verfolgten wir im Rahmen des MICROCORE Projektes einen alternativen Ansatz. Das Hauptziel dieses Projektes lag im Vergleich von Genexpressionsmustern zwischen Felchen mit normalen bzw. deformierten Geschlechtsorganen mit Hilfe der modernen Microarray-Technologie. Microarray-Analysen erlauben die Expression von allen Genen eines Organismus gleichzeitig zu messen. Dies liefert sehr genaue Informationen darüber, welche Gene unter bestimmten Umweltbedingungen (z.B. in Gegenwart von chemischen Stoffen oder bestimmten Krankheitserregern) mehr oder weniger exprimiert werden. Die Identität der Gene, deren Expression mit einem bestimmten Phänotyp korreliert sind (z.B. mit missgebildeten Geschlechtsorganen), könnte wichtige Hinweise über die Natur der Ursachen liefern. Der hier geschilderte Ansatz hat also gezielt modernste Methoden der Molekularbiologie zur Untersuchung komplexer Fragen in der Umweltforschung genutzt – eine Vorgehensweise, die zunehmend an Bedeutung gewinnt und unsere Möglichkeiten deutlich verbessert, Umweltphänome zu erfassen, zu analysieren und zu verstehen.

Um für allfällige Effekte von genetischen Populationsunterschieden auf die Genexpressionsmuster kontrollieren zu können, musste in einer Vorstudie die genetische

Populationsstruktur der verschiedenen Felchenformen mittels hochvariabler Mikrosatelliten-Marker erfasst werden. Die hierzu notwendige intensive Beprobung aller bekannten Felchenlaichplätze lieferte zusätzlich detaillierte Grundlagendaten zu den epidemiologischen Untersuchungen der Gonadenveränderungen (BITTNER ET AL., 2009) und zur genetischen Populationsstruktur der verschiedenen Felchenformen in Thuner-, Brienz- und Bielersee (BITTNER ET AL., IN VORB.B). Die Information über die genetische Populationsstruktur wiederum erlaubte die Überprüfung, ob das Auftreten von deformierten Geschlechtsorganen eine Folge rezenter Hybridisierung zwischen den verschiedenen genetisch differenzierten Felchenformen sein, oder allenfalls mit Inzuchteffekten in Verbindung stehen könnte.

Aufgrund dieser intensiven Vorarbeiten wurden schliesslich für die Microarray-Analysen ‚normale‘ (mit symmetrischen Gonaden ohne andere Gonaden-Veränderungstypen) und ‚deformierte‘ Felchen (mit Verwachsungen, mit oder ohne andere Gonaden-Veränderungen) von einem Brienzlig- und einem Albock-Laichplatz beprobt. Wir beschränkten uns auf die Männchen, um zusätzliche Unterschiede in der Genexpression durch Geschlechtsunterschiede ausschliessen zu können. Über 500 Felchen pro Laichplatz mussten beprobt werden, um die angestrebten homogenen Gruppen à 15 Individuen zu erhalten. Nebst dem Geschlecht versuchten wir ebenfalls bezüglich Altersverteilung und Anzahl Kiemenreusendornen (wichtiges morphologisches Merkmal in Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme) möglichst gleichartige Gruppen zu erhalten. Leber- und Kopfnierengewebeproben wurden gesammelt, da wir aufgrund von anderen Studien von diesen Geweben eine vielfältige Genexpression erwarteten. Zusammengefasst wurden je 30 Brienzlig und Alböcke für die Microarrays beprobt, wobei innerhalb jeder Felchenform je 15 normale und 15 deformierte Tiere vertreten waren (total 60 Fische).

Die Microarray-Daten bestehen aus rund 88'000 Datenpunkten pro Individuum, wobei für beide Gewebe jedes Gen aus Kontrollgründen doppelt gemessen wurde. 22'000 Gene wurden in jedem Individuum untersucht, d.h. das gesamte codierende Genom war abgedeckt. Die Reproduzierbarkeit der Messungen war extrem hoch, mit einem R^2 von über 0.99. Sogar wenn wir die Messungen von denselben Felchen aus einem anderen Stück derselben Gewebeprobe in einem separaten Experiment wiederholten war die Reproduzierbarkeit hoch ($R^2 > 0.97$). Dies spricht für eine hohe Qualität der Arraydaten.

Die genetischen Untersuchungen wurden am Institut für Ökologie und Evolution, Abteilung Populationsgenetik (CMPG) der Universität Bern durchgeführt. Die Microarray-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. A. Cossins der Universität Liverpool durchgeführt. Seine Forschungsgruppe gehört zu den Führenden auf dem Gebiet der Microarray-Technologie zur Untersuchung physiologischer Prozessen bei Fischen.

Zusammenfasst wurden mit den genetischen und den Microarray-Analysen folgende konkrete Fragestellungen untersucht:

- 1) Sind Hybridisierungsprozesse zwischen den Felchenformen oder Inzuchteffekte innerhalb der Formen des Thunersees ursächlich für Deformationen in der Gonadenmorphologie?
- 2) Erlauben die Microarray-Analysen eine Identifikation von bestimmten Genen und physiologischen Prozessen, welche mit den Gonadenveränderungen in Zusammenhang stehen? Könnten diese Hinweise auf potentielle Verursacher liefern?

(1) Tatsächlich konnte zwischen den beiden sommerlaichenden Felchenformen Brienzlig und Kropfer eine rezente Hybridisierung nachgewiesen werden (**BITTNER ET AL., EINGEREICHT**). Es bestand jedoch kein Zusammenhang mit den Gonadenveränderungen: Diese waren bei Hybriden nicht signifikant häufiger zu finden (Abb. 5).

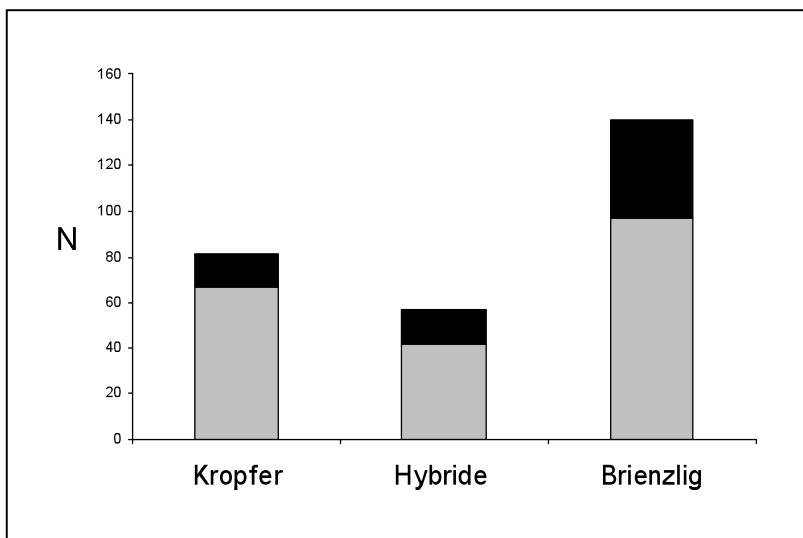


Abb. 5: Anzahl normaler (graue Fläche) und veränderter Felchen (schwarze Fläche) bei genetisch ‚reinen‘ Kropfer und Brienzlig, sowie Hybriden von Kropfer X Brienzlig aufgrund einer Einteilung der ‚Structure‘ Analyse (siehe **BITTNER ET AL., EINGEREICHT**).

Es fanden sich ebenfalls keine Hinweise, dass Felchen mit Gonadendeformationen eine tiefere individuelle genetische Variabilität aufwiesen als normale Felchen. Dies bedeutet dass Felchen mit Gonadendeformationen nicht messbar stärker ingezüchtet waren als Felchen mit normalen Gonaden. Diese Daten sind inzwischen ausgewertet, aber noch nicht in einem Manuskript zusammengestellt.

(2) Trotz der grossen Anzahl an analysierten Genen unterschieden sich die Expressionsmuster zwischen normalen und deformierten Felchen nur schwach (**BITTNER ET AL., IN VORB. A**). Lediglich ein einzelnes Kandidaten-Gen konnte in der Niere identifiziert werden, welches in deformierten Fischen beider Felchenformen eine signifikant höhere Expression zeigte. Die Analysen auf der Ebene ganzer Stoffwechselwege hingegen ergaben deutliche Unterschiede in den Expressionsmustern funktioneller Gruppen von Genen zwischen deformierten und normalen Tieren. In beiden Felchenformen und in beiden Geweben (Leber und Niere) zeigten sich signifikante Unterschiede in einer Hochregulation des Immunsystems. Dies deutet darauf hin, dass die deformierten Felchen unter einem erhöhten physiologischen Stress stehen. Die sehr schwachen Unterschiede in der Genexpression auf dem Niveau einzelner Gene lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass wir zum Zeitpunkt der Messung lediglich das Ausklingen einer früheren stärkeren Reaktion erfassen konnten. Dies scheint umso plausibler, da gezeigt wurde, dass die Gonadenveränderungen mit dem Fressen von Zooplankton in Zusammenhang stehen (**BERNET ET AL., IN VORB.**). Zum Zeitpunkt der Beprobung der Felchen auf ihren Laichplätzen haben die Tiere jedoch bereits wochenlang nicht mehr gefressen.

In Zusammenhang mit dem disregulierten Immunsystem war eine Gruppe von Genen der Komplement-Aktivierung besonders prägnant exprimiert. Eine Aktivierung des Komplementsystems in Fischen wird durch infektiöse Pathogene (Bakterien, Viren, Pilze) verursacht. Hinweise auf Infektionen als Ursachen für die Gonadenveränderungen wurden bislang jedoch keine gefunden (**BERNET ET AL., 2004**). Zusätzlich sind die Unterschiede in der Expression sehr schwach, was wir in Zusammenhang mit einem Pathogen nicht erwarten würden (z.B. Roberge et al., 2007). Alternativ können solche Genexpressionsmuster bei einer Autoimmunreaktion erwartet werden. Wir stellen daher die Hypothese auf, dass die Gonadenveränderungen möglicherweise durch eine chronische Entzündung der Gonaden zustande kommen, d.h. durch eine Autoimmunkrankheit. Autoimmunkrankheiten führen bei einem chronischen Verlauf zu Gewebeveränderungen und Organschädigungen (Toskos & Fleming, 2004). Bei Regenbogenforellen konnte festgestellt werden, dass die Gonaden autoimmun-charakteristische Läsionen zeigten, welche passiv mit anti-Spermien Antikörper immunisiert wurden (Secombes et al., 1985). Reife Spermien entstehen erst lange nachdem die Immuntoleranz gegen körpereigene Stoffe etabliert wurde. Eine Blut-Testis-Barriere verhindert im gesunden Zustand eine Autoimmunreaktion gegen die eigenen Spermien.

Die Autoimmunhypothese wird durch eine ganze Reihe anderer signifikanter physiologischer Prozesse unterstützt, welche Autoimmunitätserkrankungen auslösen können (**BITTNER ET AL., IN VORB. A**), z.B. GTPase-Aktivierung und Ras Protein Signaltransduktion (Pernis, 2008).

Autoimmunität wurde bei Fischen, wenn auch selten, bereits nachgewiesen. Bei einer Impfstudie in Lachsen beispielsweise zeigten die betroffenen Tiere Läsionen der inneren Organe (Koppang et al., 2008). Aber selbst wenn die Disregulation des Immunsystems nicht eine sekundäre (als Antwort auf die Veränderungen), sondern wie erwähnt eine primäre Reaktion (Autoimmunreaktion) sein sollte, bleibt die Frage, was die erhöhte Rate an Autoimmunitätserkrankungen bei Felchen auslöst.

In der Tat bringen diverse Studien eine Erhöhung an Autoimmunitätserkrankungen in Beziehung mit einer zunehmenden Umweltbelastung durch verschiedenste Stoffe, sogenannte Xenobiotika (Banerjee et al., 2008). Xenobiotische Substanzen sind Stoffe, welche in einem Organismus gefunden werden, welche jedoch dort nicht erwartet werden und auch nicht vom Organismus produziert werden. Einen interessanten Hinweis könnte uns allerdings das identifizierte Kandidaten-Gen liefern, welches für Ictacalcin kodiert. Ictacalcin ist ein Calcium bindendes Protein und zeigte interessanterweise ebenfalls eine erhöhte Expression im Nierengewebe von Regenbogenforellen, welche mit TCDD, einem Dioxin, behandelt wurden (Cao et al., 2003). Andererseits muss erwähnt werden, dass die genaue Funktion von Ictacalcin noch nicht bekannt ist und dass Calcium in verschiedensten physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Die isolierte Induktion von Ictacalcin allein ist daher noch nicht beweiskräftig genug für eine tatsächliche Exposition der Felchen im Thunersee gegenüber Dioxin-ähnlichen Substanzen.

Die Microarray-Analysen führten zu neuen und überprüfbaren Hypothesen zur Ursachenerforschung der Gonadenveränderungen im Thunersee. Diese Hypothesen sind momentan Gegenstand laufender Untersuchungen. So wird einerseits am Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin ein Protokoll optimiert zur Messung von Cytochromen in der Leber von Felchen. Cytochrome sind Biomarker für die Präsenz von PCB und Dioxin-ähnlichen Substanzen in der Umwelt. Andererseits wird am Inselspital in Zusammenarbeit mit dem Institut für Immunologie aufgrund neuer Probenahmen versucht, direkt in den veränderten Gonaden Auto-Antikörper nachzuweisen, um die Autoimmunhypothese als direkten Auslöser der Veränderungen entweder zu verifizieren oder allenfalls ausschliessen zu können. Insgesamt haben die hier diskutierten molekularbiologischen Arbeiten eine wichtige Erweiterung und Ergänzung der oben vorgestellten Expositionsversuche und epidemiologischen Arbeiten gebracht. Dies zeigt beispielhaft, wie die Kombination unterschiedlicher wissenschaftlicher Ansätze weiterführen kann in Verständnis und Bewertung von ökologischen Veränderungen.

8 Schlussfolgerungen

Nur ein ganzheitlicher inter- und transdisziplinärer Ansatz mit Wissenschaftlern, Behörden und Berufsfischern konnte bei der Erforschung des Rätsels vom Thunersee Erfolg haben. Wir haben mit unseren Untersuchungen aus den beiden Instituten Grundlagendaten zur Beschreibung der normalen Gonadenentwicklung der Felchen, zur Charakterisierung der Gonadenpathologien, zur epidemiologischen Einschätzung des Problems, zur Relevanz von hormonaktiven Stoffen, zu genetischen Faktoren, zu Unterschieden von Genexpressionsmustern und diversen Umweltparametern als mögliche Ursachen der Gonadenveränderungen der Thunerseefelchen beigetragen. Wir konnten zeigen, dass das Phänomen bei den Felchen vom Thunersee in seiner Ausprägung weltweit einzigartig ist, aber auch eine natürlich vorhandene Variabilität der Gonadenmorphologie vorkommt. Zudem waren gewisse Felchenformen mehr betroffen als andere. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Gonadenveränderungen weder Folge einer rezenten Hybridisierung zwischen den genetisch differenzierten Felchenformen, einer Inzucht, oder einer unsachgemäßen Aufzucht der Felchen in der Fischzucht sind, noch in Zusammenhang mit hormonaktiven Substanzen in der Thunersee-Umwelt oder mit der Vererbung stehen. Wegweisend sind die Erkenntnisse, dass das Zooplankton im Thunersee bei der Entstehung der Gonadenveränderungen die entscheidende Rolle spielt. Es wäre möglich, dass eine Akkumulation xenobiotischer Stoffe im Zooplankton zu einer Autoimmunitätserkrankung führt. Diese durch unsere Microarray-Studie aufgeworfenen Fragestellungen werden gegenwärtig in zwei separaten Follow-up-Untersuchungen abgeklärt.

Wir haben mit unserer Forschung und interdisziplinären Arbeit aus den beiden Instituten und in der transdisziplinären Zusammenarbeit mit zahlreichen öffentlichen und privaten Institutionen und Personen einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis des Phänomens am Thunersee geleistet und damit zu einer Versachlichung der Diskussion um das gesellschaftlich wichtige Thema beigetragen. Unsere Erkenntnisse lieferten wegweisende Impulse für zukünftige Ursachenabklärungen. Das Rätsel vom Thunersee ist zwar noch nicht gelöst, aber der von uns eingeschlagene Weg erscheint vielversprechend.

9 Dank

Daniel Bernet und David Bittner bewerben sich mit den vorliegenden Arbeiten für den Berner Umweltforschungspreis. Doch die federführende Leitung aller vorgestellter Untersuchungen liegt ganz klar bei unseren Vorgesetzten Prof. Helmut Segner, FIWI, und PD Dr Carlo Largiadèr, Institut Evolution und Ökologie, Abteilung Populationsgenetik (CMPG) / Institut Klinische Chemie, Inselspital Bern. Sie waren dafür verantwortlich, dass eine ganze Reihe von Arbeiten überhaupt zustande kam. Ihrer Initiative ist es zu verdanken, dass wir in diesem spannenden Umfeld arbeiten durften. Für ihre profunde wissenschaftliche Expertise und die professionelle hervorragende Betreuung möchten wir uns ganz herzlich bedanken. Ganz besonders möchte sich David Bittner bei Carlo Largiadèr für die Ermöglichung einer äusserst spannenden und vielfältigen Doktorarbeit bedanken.

Prof. Marcel Güntert vom Naturhistorischen Museum der Burgergemeinde Bern (NMBE) möchten wir herzlichst danken, unsere Arbeit für den Berner Umweltforschungspreis 09/10 nominiert zu haben. Dr. Christian Kropf (NMBE) danken wir für die Durchsicht und Verbesserung einer früheren Version dieses Antrags.

Wir bedanken uns beim Institut für Evolution und Ökologie, insbesondere Prof. Laurent Excoffier, welcher David Bittner die Durchführung seiner Doktorarbeit in der Abteilung Populationsgenetik (CMPG) ermöglicht hat. Für seine wissenschaftliche Betreuung sind wir zutiefst dankbar.

Prof. A. Cossins von der Universität Liverpool danken wir für die Zusammenarbeit bei den Microarray-Analysen. Ohne die hochtechnologisierte Infrastruktur seines Labors und des zur Verfügung gestellten Know-how wären diese Untersuchungen nicht möglich gewesen. Insbesondere danken wir L. Rainbow und L. Olohan für die Durchführung wichtiger Vorversuche und die Assistenz während der Durchführung der Experimente selbst.

Wir möchten uns bedanken bei allen Mitarbeitern des FIWI, insbesondere T. Wahli, S. Kipfer, B. Müller und M. Wenger für die Mitarbeit bei den aufwändigen Probenahmen und die allzeitige Bereitschaft, bei Bedarf zu helfen. Dem Histologie-Labor des Instituts für Tierpathologie danken wir für die unzähligen histologischen Schnitte von Felchengonaden.

Gebührender Dank gilt ebenfalls allen Mitarbeitern der Abteilung Populationsgenetik (CMPG). Spezieller Dank gebührt ebenfalls U. Amstutz, P. Vonlanthen, D. Wegmann, P. Berhier, S. Fink, M. Fischer, A. Britschgi, M. Bia, A. Champigneulle, S. Tellenbach, G. Rigoli und S. Neuenschwander für ihre Mithilfe und Mitarbeit in einer oder anderen Weise während der Doktorarbeit von David Bittner.

Ein herzliches Dankeschön dem Fischereiinspektorat des Kantons Bern für das entgegengebrachte Vertrauen in unsere Arbeit. Ohne die Unterstützung des Inspektorats bei der Beschaffung von Forschungsgeldern, der Kommunikation gegen aussen, der zur Verfügungsstellung von Infrastruktur, Know-how und Mitarbeitern wären die Aufzuchtversuche nicht möglich gewesen. Die Aufzuchtsexperimente der Felchen und die Planktonverfütterung waren nur machbar durch die tägliche Mithilfe von M. Flück, U. Gutmann, H. Haussener, C. Heitz, U. Lehmann, B. Rieder, M. Schmid and H. Walter.

Wir bedanken uns auch bei der Fischereiverwaltung Uri, insbesondere HR. Zieri, für die Aufzucht von Felchen am Standort Flüelen.

Der Standort Thun wurde äusserst zuverlässig betreut von HR. Kernen.

Den Berufsfischern vom Thunersee (K. Klopfenstein, E. Meyer, H. Moser, H. Sieber, R. Thomann, A. Wicht), Brienersee (B. Abegglen, HP. Kaufmann) und Bielersee (HP. & S. Dasen, C. Dubler, G. Pilloud, M. Martin, R. Grimm, S. Solca) danken wir für deren Bereitschaft, unseren Wünschen entsprechend Fische zu fangen. Sie waren wichtige Partner ohne deren Erfahrung und praktisches Wissen wir nicht an die wichtigen Proben gelangt wären.

Dem Amt für Wasser und Abfall des Kantons Bern, namentlich U. Ochsenbein, M. Zeh und J.D. Berset danken wir für die Zusammenarbeit, chemo-analytische Untersuchungen und die Hilfe bei der Beschaffung von Seesedimenten.

C. Wedekind, Department of Ecology and Evolution Lausanne, danken wir für die Mithilfe bei der Befruchtungsaktion von Felchen im Dezember 2004 zur Gewinnung von Felcheneiern.

Agroscope FAM Wädenswil (T. Poiger), EAWAG (M. Suter, A. Liedtke, R. Schneeberger), EMPA (A. Gerecke, M. Kohler, C. Bogdal und U. Spörri) unterstützten uns in der analytischen Überprüfung der verwendeten Nominalkonzentrationen der getesteten Stoffe TNT, Östrogen und Naphthalinsulfonate.

Ruedi Müller danken wir für zahlreiche Tipps bei der Aufzucht von Felchen-Larven und für sein offenes Ohr bei Fragen zur Biologie der Felchen.

J. Matthieu (armasuisse, Thun) stellte uns das TNT für die Experimente der Felchenerbrütung auf Thunersee-Sediment zur Verfügung.

Wir bedanken uns bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Felchengonaden Thunersee“ für die Begleitung und die angeregten Diskussionen während des Projekts.

Zahlreiche Helfer unterstützten uns bei den intensiven und aufwändigen Probenahmen unzähliger Felchen: S. Aeschbacher, M. Bärlocher, K. und S. Bittner, C. Bogdal, M. Bula, A. Brügger, L. Dalla Torre, S. Furrer, A. Jacob, M. Klenk, M. Kohler, F. Kölliker, C. Lany, A.

Liedke, M. Mezelar, A. Möller, P. Nyffeler, T. Obwegeser, R. Ott, M. Printz, D. Pugovkin, H. Rohrbach, M. Schweizer, M. Stettler, B. Thorenz, R. Ventresca, N. Weyenneth und N. Wiedemar.

Wir danken dem Elektrizitätswerk Thun für die Benützung von Räumlichkeiten bei den Probenahmen.

Der Nationalfond Schweiz, das Fischereiinspektorat Bern und das Bundesamt für Umwelt ermöglichte unsere Forschung durch finanzielle Unterstützung

Wenn man über eine so lange Zeitdauer an einem derart vielschichtigen Thema arbeitet, begegnet man vielen Personen, die in irgendeiner Art und Weise, mit Rat oder Tat einen Beitrag zur Lösung des Problems am Thunersee beigetragen haben und die in dieser Danksagung nicht namentlich erwähnt wurden. Ein herzliches Dankeschön all diesen Beteiligten für die Mitarbeit bei diversen Projekten zur Lösung des Rätsels des Thunersees.

10 Referenzen

- Allen Y, Matthiessen P, Scott AP, Haworth S, Feist S, Thain JE (1999) The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments – further survey of flounder. *Sci Total Environ* 233:5-20.
- Banerjee BD, Chakraborti A, Suke SG, Ahmed RS, Tripathi AK (2008) Xenobiotic-induced immune alterations: Implications in health and disease. *Ind. J. B. B.*
- BERNET D, WAHLI T, KUENG C, SEGNER H (2004)** Frequent and unexplained gonadal abnormalities in whitefish (central alpine *Coregonus* sp.) from an alpine oligotrophic lake in Switzerland. *Diseases of Aquatic Organisms* 61:137-148.
- BERNET D, WAHLI T, KÜNG C, ZIERI HR, SEGNER H (IN VORB.)** Zooplankton as the key factor for the development of macroscopical gonad deformation in whitefish from Lake Thun. Manuskript Vor Submission.
- BERNET D, LIEDTKE A, BITTNER D, EGGEN RIL, KIPFER S, KÜNG C, LARGIADER C, SUTER MJ-F, WAHLI T, SEGNER H (2008)** Gonadal Malformations in Whitefish from Lake Thun: Defining the Case and Evaluating the Role of endocrine disrupting chemicals. *Chimia* 62:383-388.
- BERNET D, WAHLI T, KIPFER S, SEGNER H (EINGEREICHT)** Macroscopical gonad deviations and intersex in developing whitefish (*Coregonus lavaretus*). Eingereicht bei *Aquatic Biology*.
- Berset JD, Ochsenbein U, Zeh M (2007) Are Lake Thun and Lake Brienz contaminated with explosive residues? *Chimia* 61: 532-532.
- BITTNER D, BERNET D, WAHLI T, SEGNER H, KÜNG C, LARGIADER CR (2009)** How normal is abnormal? – Discriminating between deformations and natural variation in gonad morphology of European whitefish *Coregonus lavaretus*. *Journal of Fish Biology*. Accepted.
- BITTNER D, COSSINS AR, SEGNER H, EXCOFFIER L, LARGIADER CR (IN VORB. A)** Identification of candidate genes and physiological pathways involved in gonad deformation in whitefish (*Coregonus lavaretus*, L.) from Lake Thun, Switzerland. In Vorb. A
- BITTNER D, VONLANTHEN P, EXCOFFIER L, LARGIADER CR (IN VORB. B)** Multiple forms of whitefish (*Coregonus lavaretus*) in Swiss lakes cannot solely be explained by sympatric speciation. In Vorb. B
- BITTNER D, EXCOFFIER L, LARGIADER CR (VOR SUB.)** Rapid morphological evolution and hybridization between sympatric European whitefish forms (*Coregonus lavaretus*) in a Swiss lake. Vor Submission
- Bogdal C, Naef M, Schmid P, Kohler M, Zennegg M, Bernet D, Scheringer M, Hungerbühler K (2009) Unexplained Gonad Alterations in Whitefish (*Coregonus* spp.) from Lake Thun, Switzerland: Levels of Persistent Organic Pollutants in Different Morphs. *Environmental Science & Technology*. Accepted
- Cao ZJ, Tanguay RL, McKenzie D, Peterson RE, Aiken JM (2003) Identification of a putative calcium-binding protein as a dioxin-responsive gene in zebrafish and rainbow trout. *A. Tox.* 63:271-282.
- Demska-Zakes K, Mamcarz A (1996) Gonadal abnormalities in *Coregonus peled* Gmel. x *Coregonus lavaretus* L. hybrids, introduced into natural waters. In: Kirchhofer A, Hefti D (eds) *Conservation of endangered freshwater fish in Europe*. p 225-232. Basel: Birkhauser.
- Escher M (2001) Gonadenveränderungen bei Felchen aus dem Thunersee. Literaturrecherche und Empfehlung. Im Auftrag für das Fischereinspektorat des Kantons Bern, Schweiz.
- Escher M (2002) Fruchtbarkeit der winterlaichenden Felchen im Thunersee. Im Auftrag des Fischereinspektorates des Kantons Bern.
- Escher M (2004) Fruchtbarkeit der herbstlaichenden Brienzlig im September 2004. Im Auftrag des Fischereinspektorates des Kantons Bern.
- Fischereinspektorat Bern (2008) ‚Veränderte Geschlechtsorgane bei Thunerseefelchen‘. Volkswirtschaftsdirektion VOL, Bern.

- Fitzsimons JD, Cairns VW (2000) Prevalence of a testicular anomaly in Lake Trout (*Salvelinus namaycush*) of the Great Lakes Basin. *J Gr Lakes Res* 26:74-81.
- Forlin F, Norrgren L (1998) Physiological and morphological studies of feral perch before and after remediation of a PCB contaminated lake – Lake Järnsjön. *Ambio* 27:411-418.
- Goto R, Abe Y, Masai K, Yamaha E, Adachi S, Yamauchi K (1999) Effects of environmental factors on sex differentiation in goldfish *Carassius auratus*. In: Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO (eds) Reproductive physiology of fish. Proceedings of the 6th International Symposium, Bergen.
- KIPFER S, SEGNER H, WENGER M, WAHLI T, BERNET D** (2009) Long term estrogen exposure of whitefish (*Coregonus lavaretus*) induces intersex but not the Lake Thun-typical gonad malformations. *Diseases of Aquatic Organisms*. Accepted.
- Koppang EO, Bjerkas I, Haugarvoll E, et al. (2008) Vaccination-induced systemic autoimmunity in farmed Atlantic salmon. *J. Im.* 181:4807-4814.
- Liedtke A (2008) Rätselhaft: Missgebildete Thunersee-Felchen. *EAWAG news* 64d:13-15.
- Luksiene D, Sandström O, Lounasheimo L, Anderson J (2000) The effects of thermal effluent exposure on the gametogenesis of female fish. *J Fish Biol* 56:37-50.
- Meder D (1984) Morphologische Untersuchungen an den Gonaden der wichtigsten Fischarten im Königsee. Dissertation Ludwig-Maximilians Universität München, Deutschland
- Pernis, AB (2008) Rho GTPase-mediated pathways in mature CD4⁺ T cells. *A. Rev.* 8: 199-203.
- Ochsenbein U, Zeh M, Berset JD (2008) Comparing solid phase extraction and direct injection for the analysis of ultra-trace levels of relevant explosives in lake water and tributaries using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 72:974–980.
- Roberge C, Paez DJ, Rossignol O, Guderley H, Dodson J, Bernatchez L (2007) Genome-wide survey of the gene expression response to saprolegniasis in Atlantic salmon. *Mol. Imm.* 44, 1374-1383.
- Rodgers-Gray TP, Jobling S, Kelly C, Morris S, Brighty G, Waldock M, Sumpter JP, Tyler CR (2000) Exposure of juvenile roach, *Rutilus rutilus*, to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal development. *Environ Sci Technol* 35:462-470.
- Secombes CJ, Lewis AE, Laird LM, Needham EA, Priede IG (1985) Role of Autoantibodies in the Autoimmune-Response to Testis in Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri*). *Im.* 56:409-415.
- Toskos GC, Fleming SD (2004) Complement in Autoimmunity. Karger, Basel.
- Urbach D, Bittner D, Lenz T, Bernet D, Wahli T, Wedekind C (2007). Sperm velocity in an Alpine whitefish: effects of age, size, condition, fluctuating asymmetry and gonad abnormalities. *Journal of Fish Biology* 71 (3): 672-683.

11 Beigelegte eigene Manuskripte

11.1 Publiziert

BERNET D, WAHLI T, KUENG C, SEGNER H (2004) Frequent and unexplained gonadal abnormalities in whitefish (central alpine *Coregonus* sp.) from an alpine oligotrophic lake in Switzerland. DAO 61:137-148.

BERNET D, LIEDTKE A, BITTNER D, EGGEN RIL, KIPFER S, KÜNG C, LARGIADÈR C, SUTER M J-F, WAHLI T, SEGNER H (2008) Gonadal Malformations in Whitefish from Lake Thun: Defining the Case and Evaluating the Role of endocrine disrupting chemicals. Chimia 62:383-388.

11.2 Akzeptiert

BITTNER D, BERNET D, WAHLI T, SEGNER H, KÜNG C, LARGIADÈR CR (2009) How normal is abnormal? – Discriminating between deformations and natural variation in gonad morphology of European whitefish *Coregonus lavaretus*. Journal of Fish Biology (accepted).

KIPFER S, SEGNER H, WENGER M, WAHLI T, BERNET D (2009) Long term estrogen exposure of whitefish (*Coregonus lavaretus*) induces intersex but not the Lake Thun-typical gonad malformations. Diseases of Aquatic Organisms. (accepted).

11.3 Eingereicht oder vor Submission

BERNET D, WAHLI T, KIPFER S, SEGNER H (SUBMITTED) Macroscopical gonad deviations and intersex in developing whitefish (*Coregonus lavaretus*). Eingereicht bei Aquatic Biology.

BERNET D, WAHLI T, KÜNG C, ZIERI HR, SEGNER H (IN VORB.) Zooplankton as the key factor for the development of macroscopical gonad deformation in whitefish from Lake Thun. Manuskript vor Submission.

BITTNER D, COSSINS AR, SEGNER H, EXCOFFIER L, LARGIADÈR CR (IN VORB. A) Identification of candidate genes and physiological pathways involved in gonad deformation in whitefish (*Coregonus lavaretus*, L.) from Lake Thun, Switzerland. In Vorb. A, 1st Draft.

BITTNER D, VONLANTHEN P, EXCOFFIER L, LARGIADÈR CR (IN VORB. B) Multiple forms of whitefish (*Coregonus lavaretus*) in Swiss lakes cannot solely be explained by sympatric speciation. In Vorb. B

BITTNER D, EXCOFFIER L, LARGIADÈR CR (VOR SUB.) Rapid morphological evolution and hybridization between sympatric European whitefish forms (*Coregonus lavaretus*) in a Swiss lake. Vor Submission