

and b) the ability of the described ¹³ Y-organs to synthesize ecdysones in vitro. From the molting hormone titer curve of *Orconectes*, which exhibits a steep increase to its maximum during the premolt stage D₂¹⁵, a maximum metabolic activity of the organs is expected during this stage.

Experimental and results. 40 μ Ci (4-¹⁴C)-cholesterol (59.2 mCi/mmol) were emulsified in 250 μ l of VAN HARREVELD's saline¹⁶ with 10 mg of Tween 20 by sonication. 50 μ l of this solution were injected in each of 5 male crayfish (*Orconectes limosus* Rafinesque) at premolt stage D₂ through the arthroal membrane of a chela. The animals were kept at 15°C in 500 ml each of tap water for 20 h. The total radioactivity of the water was then 0.71 μ Ci indicating that only little activity was lost by bleeding or excretion during the incubation. The animals were killed and homogenized in 60% methanol in water. Non-radioactive carrier α - and β -ecdysone were added to the homogenate and the hormones isolated by counter-current distribution between *n*-butanol and water¹⁷ and thin-layer chromatography (TLC) on Kieselgel GF₂₅₄-plates developed with chloroform-*n*-propanol (9:5, v/v)¹⁸ as described for molting hormone isolation from crayfish material¹⁵. After the 3rd TLC, the α -ecdysone fraction had a radioactivity (corrected to 100% efficiency) of 9.9×10^3 dpm (0.011% of that of the incorporated substrate) and the β -ecdysone fraction had 7.8×10^3 dpm (0.009%). Each fraction was acetylated with acetic acid anhydride-pyridine for 6 h at room temperature and the resulting tetra- and triacetates separated by TLC on Kieselgel GF₂₅₄-plates developed with ethyl acetate-hexane (4:1, v/v)¹⁹. The UV-absorbing acetates were eluted and their radioactivity determined. 84% of the radioactivity which was employed for the acetylation of α -ecdysone were found to coincide with α -ecdysone-2, 3, 22, 25-tetra-acetate (Rf 0.64) and 6% coincided with α -ecdysone-2, 3, 22-tri-acetate (Rf 0.35). 73% of the radioactivity which was used for the acetylation of β -ecdysone coincided with β -ecdysone-2, 3, 22, 25-tetra-acetate (Rf 0.48) and 9% with β -ecdysone-2, 3, 22-tri-acetate (Rf 0.25).

22 Y-organs of stage D₂ premolt crayfish were extirpated as described²⁰. The organs were incubated for 20 h at 25°C with 100 μ Ci of tritiated cholesterol (12.1 Ci/mole) in 1 ml medium consisting of 500 μ l VAN HARREVELD's saline¹⁶, 500 μ l of a 10.000 g supernatant of hemo-

lymph from premolt crayfish, 2 mg glucose, and 0.1 mg Aureomycin®. Additionally, the medium contained 200 ng of each α - and β -ecdysone in order to protect eventually formed labelled ecdysones from oxydation. It was attempted to obtain Y-organs and hemolymph aseptically. The other constituents of the medium were heat-sterilized. The incubation was terminated by addition of methanol, the organs were homogenized and the mixture analyzed for the presence of labelled ecdysones as described. After the 3rd TLC, the α -ecdysone fraction had a radioactivity of 32.5×10^3 dpm (0.015% of the total initial radioactivity) and the β -ecdysone fraction had 23.8×10^3 dpm (0.011%). After brief acetylation (2 h) of each fraction and separation of the resulting mixtures by TLC, 4 radioactive products were found which co-chromatographed with the acetylation products of authentic α - and β -ecdysone respectively. The acetates of the α -ecdysone fraction contained 77% of the radioactivity which was employed for the reaction, those of the β -ecdysone fraction contained 80%.

Discussion. The results demonstrate that the Y-organs of *Orconectes* described by BURGHause¹³ synthesize molting hormones. Molting is prevented by extirpation of these glands indicating that they are the sole organs of crayfish which are capable of molting hormone biosynthesis. Other organs of macrurans which have been described as 'Y-organs'⁷⁻¹⁰ probably do not function as molting glands and require further investigation.

The finding that the Y-organs of *Orconectes* synthesized both α - and β -ecdysone in vitro differs from the result of BOLLENBACHER and O'CONNOR⁶ who obtained only α -ecdysone with in vitro cultured Y-organs of a crab. Since α -ecdysone is rapidly converted to β -ecdysone by crustacean tissues¹³, we cannot exclude the possibility that the labelled α -ecdysone produced in our incubations is eventually hydroxylated to β -ecdysone by small pieces of epidermal tissue adhering to the explanted Y-organs.

¹⁵ A. WILLIG and R. KELLER, J. comp. Physiol. 86, 377 (1973).

¹⁶ A. VAN HARREVELD, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 34, 428 (1938).

¹⁷ P. KARLSON and E. SHAAVA, J. Insect Physiol. 10, 797 (1964).

¹⁸ D. S. KING and J. B. SIDDALL, Nature, Lond. 227, 955 (1969).

¹⁹ N. J. DE SOUZA, E. L. GHISALBERTI, H. H. REES and T. W. GOODWIN, Biochem. J. 114, 895 (1969).

²⁰ R. KELLER and A. WILLIG, J. comp. Physiol., in press.

Ein Progesteron-abhängiges Pheromon der weiblichen Maus

A Progesterone-Dependent Pheromone of the Female Mouse

SUZANNE BLOCH

Universitäts-Frauenklinik, Schanzenstrasse 46, CH-4056 Basel (Switzerland), 30. Januar 1976.

Summary. Female mice kept in groups exhibit less oestrous smears than females kept singly. Ovariectomized females have only slightly reduced number of oestrous smears, but ovariectomized females injected with progesterone act on other females like intact ones. It is concluded that a progesterone-dependent pheromone excreted by dioestrous females acts oestrus-depressing on other females.

Das Pheromon, das im Urin des Mäusemännchens ausgeschieden wird, und seine vielfachen Wirkungen auf das Weibchen: Blockierung der Gravidität¹, Aktivierung und Synchronisierung der Östren^{2,3}, ist vielfach untersucht und beschrieben worden. Weniger bekannt sind Pheromone der weiblichen Maus. Zwar ist die Wirkung des östrischen Weibchens auf das Männchen wohl bekannt, doch legen verschiedene Beobachtungen die Annahme

nahe, dass das Weibchen auch im Dioestrum ein Pheromon ausscheidet, das vom Progesteron abhängt und auf andere Weibchen wirkt.

¹ H. BRUCE, J. Reprod. Fert. 1, 96 (1960).

² W. K. WHITTEN, J. Endocr. 13, 399 (1956).

³ W. K. WHITTEN, J. Endocr. 18, 102 (1959).

	Resultate		
	Zahl der Östren in 20 Tagen	Mittelwerte	Differenz zu Kontrollen (<i>p</i>)
1. Kontrollen (20 Weibchen einzeln gehalten)	200	10	
2. 20 Weibchen (5 pro Käfig)	129	6,45	< 0,0001
3. 20 Weibchen (10 pro Käfig)	100	5	< 0,00001
4. 20 Weibchen «crowded» (20 pro Käfig 9 × 18 × 12 cm)	110	8	< 0,001
5. 10 Weibchen mit kastrierten Weibchen	80	6,15	< 0,05
6. 20 Weibchen mit kastrierten Weibchen (mit Progesteron injiziert)	123	6	< 0,00001
7. Die 20 Weibchen von Exper. 2 (1 Monat alt, 5 pro Käfig)	255	12,75	< 0,01

Signifikanz getestet mit Student's *t*-Test.

Als erster beschrieb ANDERVONT⁴, dass bei einzeln gehaltenen Weibchen die Genitalzyklen früher einsetzen, häufiger und während längerer Zeit eintreten als bei in Gruppen gehaltenen Weibchen. VAN DER LEE und BOOT^{5,6} beobachteten bei Weibchen, die zu vierein in einem Käfig gehalten wurden, spontan auftretende Perioden von «pseudopregnancy», die bei einzeln gehaltenen Weibchen in viel geringerem Masse auftraten. WHITTEN³ stellte bei in Gruppen gehaltenen Weibchen eine Verminderung der Östrustage mit bis zu 40tägigen Anöstrusperioden fest. Wurden die Weibchen getrennt und einzeln untergebracht, setzten die Zyklen wieder ein. Ob das Ausbleiben der Östren sich als «pseudopregnancy» oder Anöstrus manifestiert, kann von Stammesunterschieden oder von der Grösse der Gruppen herühren³. BRUCE⁷ stellte fest, dass die Zahl der durch den Geruch fremder Männchen blockierten Trächtigkeiten durch die Gegenwart anderer Weibchen vermindert wird. Bei frisch begatteten Weibchen wird die Zahl der zustande kommenden Graviditäten bei in kleinen Gruppen gehaltenen Weibchen (84%) gegenüber einzeln gehaltenen (56%) erhöht⁸.

Diese Wirkungen können alle durch Unterdrückung des Östrus erklärt werden, die durch Verstärkung der Progesteron-Wirkung zustande kommt. Die Unterdrückung des Östrus durch die Gegenwart anderer Weibchen tritt ohne die Möglichkeit optischer oder akustischer Wahrnehmung oder körperlicher Berührung ein. Bei anosmisch gemachten Weibchen erfolgt sie nicht⁹. Es scheint daher gerechtfertigt, sie auf olfaktorische Wirkung, also auf ein Pheromon, zurückzuführen. Der zweiphasische Genitalzyklus des Mäuseweibchens erlaubt die Annahme, dass in seinem Verlauf zwei verschiedene Pheromone produziert werden, und da das Diöstrum 4 bis 5mal länger währt als der Östrus, muss in einer Gruppe von Weibchen die Mehrzahl der Tiere im Diöstrum sein und ein vom Progesteron abhängiges Pheromon ausscheiden. Es wurden daher Versuche durchgeführt, um festzustellen, ob sich die Wirkung eines solchen Pheromons nachweisen lässt. Die Versuche wurden mit Mäusen des NMRI-Stammes durchgeführt, die unter den üblichen Bedingungen gehalten wurden (22°C, 12 h Licht, 12 h Dunkelheit, Futterwürfel und Wasser ad libitum). Die Tiere waren in Macrolon-Käfigen mit Metallgitter-Deckeln untergebracht (15 × 20 × 12 cm). Da die Weibchen trotz optimaler Haltung nie ganz regelmässige Zyklen aufwiesen, wurden nicht die Zyklen gezählt, sondern durch tägliche Vaginalabstriche die Zahl der Östrustage für jedes Weibchen während 20 Tagen registriert. Die Weibchen waren bei Beginn der Versuche 4 Monate alt. 1. 20 Weibchen, einzeln gehalten, dienten als Kontrollen. 2. Dieselben 20 Weibchen wurden

je 5 in einem Käfig untergebracht. 3. 20 Weibchen wurden je 10 in einem Käfig untergebracht. 4. Je 10 Weibchen aus Versuch 1 und 10 aus Versuch 3 wurden in einem kleinen Käfig (9 × 18 × 12 cm) zusammengedrängt untergebracht («crowding»). 5. 10 Weibchen wurden mit kastrierten Weibchen gehalten, je 1 Versuchswelibchen mit 9 kastrierten in einem Käfig. 6. 20 Weibchen wurden auf dieselbe Weise mit kastrierten Weibchen gehalten, denen Progesteron injiziert wurde (Proluton Depot Schering), 25 mg jeden 10. Tag. 7. Die 20 Weibchen von Experiment 2 wurden im Alter von 1 Monat je 5 in einem Käfig untergebracht (Tabelle).

Die Versuchsgruppen mit 5, 10 und 20 Weibchen differieren unter sich nicht signifikant, unterscheiden sich aber signifikant von der Kontrollgruppe der einzeln gehaltenen Weibchen. Mit kastrierten Weibchen gehaltene Tiere unterscheiden sich nur wenig von den Kontrollen (*p* < 0,05), während kastrierte Weibchen, denen Progesteron injiziert wurde, wie intakte wirken (Vergleich zu den Kontrollen *p* < 0,00001). Wir nehmen an, dass das vom Progesteron abhängige Pheromon auf die andern Weibchen einer Gruppe östrusvermindernd wirkt.

Experiment 7 betrifft die 20 Weibchen von Experiment 2 im Alter von 1 Monat, ebenfalls je 5 Tiere in einem Käfig. Die Ovarien dieser juvenilen Weibchen, die gegenüber den adulten die doppelte Zahl von Östrustagen aufwiesen, enthielten nur Follikel verschiedener Grösse und Reifegrade, aber keine Corpora lutea. Daher scheiden diese Weibchen kein vom Progesteron abhängiges Pheromon aus.

⁴ H. B. ANDERVONT, J. natn. Cancer Inst. 4, 579 (1944).

⁵ S. VAN DER LEE und L. M. BOOT, Acta physiol. neerl. 4, 442 (1955).

⁶ S. VAN DER LEE und L. M. BOOT, Acta physiol. neerl. 5, 213 (1956).

⁷ H. BRUCE, J. Reprod. Fert. 6, 451 (1963).

⁸ S. BLOCH und E. T. RIPPmann, Z. psychosom. Med. 14, 33 (1968).

⁹ W. K. WHITTEN und F. H. BRONSON, Adv. Chemorecept. 1, 309 (1970).