

I ABSTRACT

The work reported in this thesis represents an interdisciplinary approach on chemical (olfactory) communication in Zambian mole-rats of the genus *Fukomys* (family Bathyergidae, Rodentia). Although much attention has been given in this respect to rodents, the role of chemosensation (including acting signals) in these subterranean, eusocial mammals is still not well understood. Individual recognition and signals informing about the reproductive status, both providing the basis of incest avoidance and reproductive skew (Burda 1995), are of special interest particularly because their sensory mechanism remains obscure.

The chapter *Behavioural olfactory bioassays* outlines the evidence for the importance of ano-genital odour in kinship- and individual recognition in mole-rats. Contrary, urine odours did not provide sufficient sensory information in this respect.

Pilot endocrinological and colpocytological examinations in *Fukomys* reveal strong correlation between high mean estradiol- and progesterone values and sexual activity (chapter *Steroids and reproductive status*). Zambian *Fukomys* mole-rats are induced ovulators, primed exclusively through repeated and regular sexual activity and not solely through single copulation or separation from the queen as reported for the Damaraland mole rats (cf., Molteno & Bennett 2000).

The poorly understood molecular basis (outlined in the chapter *Semiochemicals – HS-SPME-GC-MS-Analysis* and in the chapter *Lipocalines (MUP's & Aphrodisin) – Proteomics*) of chemosensation was studied, by means of a solvent-free HS-SPME-GS-MS, 2D-PAGE and MALDI-TOF/TOF-tandem MS developed within the framework of this research. Using this approach, it could be demonstrated, that 51 urinary compounds constituting individual volatile urinary pattern of the mole-rat were quite similar even between members of different families. A queen-specific component, 4-nonanone, and similarly 1-hexadecanol, typical for non-reproductive daughters, were identified by mass spectra. Reproductive males (kings) could, however, not be distinguished on the basis of their urinary volatile pattern from non-reproductive males. Males displayed higher amount of β -caryophyllene in their volatile urinary pattern than females. Although altogether 41 different compounds were identified in urine of families, mole-rats cannot discriminate between different families on the base of odour. Carrot and potato diet influence the urinary composition.

Generally, individual urine variations depend on sex (male or female) and reproductive status (queens or non-reproductive females) and not on individuality per se, supporting the outcomes of behavioural bioassays.

Remarkably, a well-known lipocaline and sex pheromone of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) vaginal discharge, aphrodisin, was identified in the urine of *Fukomys* mole-rats, but without mass polymorphism and in atypically low concentration. In urine of two additionally examined genera of subterranean rodents (*Spalax* spp. and *Spalacopus* sp.), neither aphrodisin nor the lipocaline MUP (major urinary protein), generally present in the house mouse (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*¹), was found.

On these backgrounds, it is still questionable, if in *Zambian Fukomys* mole-rats aphrodisin takes on the role of a ligand carrier in the subterranean environment. Ligands such as the prospective 1-hexadecanol or 4-nonanone could be protected from degradation (once urine is deposited). Moreover, the slow release mechanism would prolong the olfactory signal which is proved with MUPs in the house mouse. Still it is not clear, if any or which meaning aphrodisin and/or the urinary volatiles have for the olfactory communication. Further research should concentrate on ano-genital odours (and body odours) because of the clear results of the behavioural assays.

¹ Further abbreviated as *M. m. musculus* and *M. m. domesticus*

II ZUSAMMENFASSUNG

In dieser interdisziplinären Arbeit werden Ergebnisse zur chemischen (olfaktorischen) Kommunikation sambischer Graumulle der Gattung *Fukomys* (Familie: Bathyergidae, Rodentia) vorgestellt. Die Rolle des olfaktorischen Sinneseindrucks (einschließlich wirksamer Geruchssignale) bei diesen subterranean, eusozialen Säugetieren ist trotz vieler Untersuchungen, die bislang bei Nagetieren unternommen wurden, noch weitgehend unverstanden. Das gilt sowohl für die Individualerkennung als auch für die Signale, die über den Reproduktionsstatus informieren. Beide Signale sind Voraussetzung für die Inzestvermeidung und die Beschränkung der Reproduktion eines Weibchens (der Königin) auf ein bis drei Männchen (Burda 1995), weshalb derartige Signale hier von besonderem Interesse sind.

In dem Kapitel *Behavioural olfactory bioassays* wird die große Bedeutung von Anogenitalgerüchen für die Verwandtschafts- und die individuelle Geruchserkennung bei Graumullen gezeigt. Im Vergleich dazu wurden in diesem Zusammenhang von den Uringüchen nicht genug Sinnesinformationen geliefert.

Endokrinologische und kolpozytologische Pilotstudien zeigten bei diesen Säugetieren eine starke Korrelation zwischen hohen Östradiol- und Progesteronwerten und der sexuellen Aktivität (Kapitel *Steroids and reproductive status*). Sambische Graumulle sind induzierte Ovulierer. Bei ihnen wird ausschließlich durch wiederholte und regelmäßig erfolgende sexuelle Aktivität die Ovulation angeregt, anders als bei den Damarensis Graumullen, bei denen nur *eine* Kopulation oder die Abwesenheit der Queen ausreicht (vgl. Molteno & Bennett 2000).

Die bislang kaum verstandene molekulare Grundlage der olfaktorischen Kommunikation (vertieft in dem Kapitel *Semiochemicals – HS-SPME-GC-MS-Analysis* und dem Kapitel *Lipocalines (MUP's & Aphrodisin) – Proteomics*) wurde anhand verschiedener hier entwickelter Methoden, wie der lösemittelfreien HS-SPME-GC-MS, der 2-D PAGE und MALDI-TOF/TOF-Tandem MS untersucht. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sich die individuellen Muster der gefundenen 51 flüchtigen Verbindungen des Urins sehr ähnlich waren. Auch bei dem Vergleich der Mitglieder verschiedener Familien ergab sich dieser Befund. Zudem wurde eine queen-spezifische Substanz, 4-Nonanon, sowie 1-Hexadecanol, als typisch für die nicht-reproduktiven Töchter, mit Hilfe von Massenspektren identifiziert. Dagegen konnten reproduktive Männchen (Könige) nicht auf Basis ihrer flüchtigen Urinverbindungen von den nicht-reproduktiven Söhnen unterschieden werden. Männchen unterscheiden sich durch signifikant höhere Mengen an

Caryophyllen im Urin von den Weibchen. Obwohl im Urin der Familien insgesamt 41 verschiedene Substanzen nachgewiesen werden konnten, waren die Graumulle nicht in der Lage, verschiedene Familien am Uringeruch zu unterscheiden. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung des Urins jeweils durch eine Karottendiät bzw. durch eine Kartoffeldiät veränderte.

In dieser Arbeit wurde belegt, dass interindividuelle Unterschiede im Urin demnach grundsätzlich vom Geschlecht (Männchen oder Weibchen) und dem Reproduktionsstatus (queen oder Tochter) abhängen und nicht von der Individualität als solcher, was mit den Ergebnissen der Verhaltensstudien übereinstimmt.

Weiterhin konnte ein bekanntes Lipokalin und Sexualpheromon aus dem Vaginalsekret des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*), Aphrodisin, bei sambischen Graumullen im Urin nachgewiesen werden, jedoch in einer auffällig geringen Konzentration und ohne Massenpolymorphismus. Im Urin zweier weiterer untersuchter subterran lebender Nagetiergattungen (*Spalax* spp. und *Spalacopus* sp.) waren dagegen weder Aphrodisin noch das gewöhnlich bei der Hausmaus (*M. m. domesticus*) vorkommende Lipokalin MUP (major urinary protein) im Urin vorhanden.

Vor diesem Hintergrund stellt sich nun die Frage, ob Aphrodisin bei sambischen Graumullen in der subterranean Umwelt die Rolle eines Liganden-Carriers übernimmt. Durch Carrier könnten Liganden, wie potentiell 1-Hexadecanol oder 4-Nonanone, vor Degradation an der Luft geschützt und durch verlangsamte Evaporation könnte, wie bei den MUPs der Hausmäuse, das Geruchssignal verlängert werden. Es ist daher noch unklar, ob und welche Bedeutung Aphrodisin und/oder die flüchtigen Urinverbindungen letztlich für die olfaktorische Kommunikation haben. Weiterführende Untersuchungen sollten sich auf die Analyse von Anogenitalgerüchen (und Körpergerüchen) konzentrieren, da die Verhaltensreaktionen hierbei eindeutig waren.