

# Identifizierung eines neuen Sexualpheromons aus Sicherungsfäden der tropischen Jagdspinne *Cupiennius salei*\*\*

Mirjam Papke, Stefan Schulz,\* Harald Tichy, Ewald Gingl und Rudolf Ehn

Professor Wittko Francke zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Chemie der Pheromone von Arachniden und insbesondere von Spinnen hat nicht die gleiche Aufmerksamkeit wie die von Insektenpheromonen erhalten,<sup>[1]</sup> obwohl Spinnen weitverbreitet vorkommen, für viele Ökosysteme wichtig und artenreich sind. Es ist bekannt, dass Seide als Pheromonsubstrat von verschiedenen Spinnen verwendet wird.<sup>[2]</sup> Trotzdem konnte bisher erst ein Pheromon identifiziert werden.<sup>[3]</sup> Die große tropische Jagdspinne *Cupiennius salei* (Ctenidae) benutzt ihren Sicherungsfaden als chemischen Wegweiser, den sie in der Umwelt zurücklässt. Ein einzelner Faden ruft das Werbungsverhalten in artigen Männchen hervor. Die Männchen erkennen das chemische Signal durch Untersuchung des Seidenfadens mit ihren Pedipalpen und fangen daraufhin an zu vibrieren. Auf diese durch das Substrat übertragenen Signale antwortet das Weibchen ebenfalls mit Vibrationen.<sup>[4]</sup> Im Folgenden berichten wir über die Identifizierung und die Synthese des weiblichen werbungsinduzierenden Pheromons.

Mit Hilfe einer elektrisch betriebenen Wickelmaschine können 5–10 mg Seide innerhalb einer Woche aus der Spinndrüse einer immobilisierten, aber wachen Spinne gezogen werden. Mit dieser Seide wurde ein Biotest entwickelt, um das aktive Prinzip identifizieren zu können. Dabei wandern die Spinnen durch einen Glaskanal, der mit Filterpapier abgedeckt ist, und treffen auf ihrem Weg auf natürliche oder chemisch modifizierte Seidenfäden. Das charakteristische Vibrationsverhalten wurde durch Seide von erwachsenen Weibchen ausgelöst.<sup>[5]</sup> Dagegen war Seide von Männchen oder jugendlichen Weibchen inaktiv. Die aktive Seide wurden mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Diese Extrakte wurden dann auf inaktive Seide aufgebracht, um sie auf ihre Aktivität hin zu testen. Methanolextrakte gaben gute Ergebnisse und wurden für die weiteren Analysen verwendet.

Mit der bei Pheromonuntersuchungen üblicherweise verwendeten GC-MS-Methode konnte nur Pyroglutaminsäuremethylester identifiziert werden. Beide Enantiomere riefen

jedoch im Biotest keine Antwort hervor. Daraufhin wurden NMR-Untersuchungen durchgeführt. Überraschenderweise fand sich in aktiven Extrakten, die mit deuteriertem Methanol erhalten wurden, nur eine Hauptverbindung, die in inaktiven Seidenproben nicht auftrat (Abbildung 1). Das Spektrum

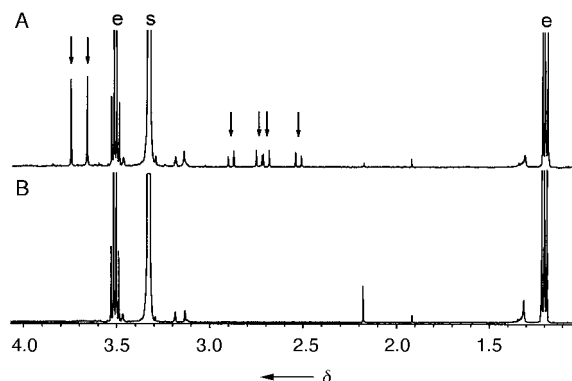
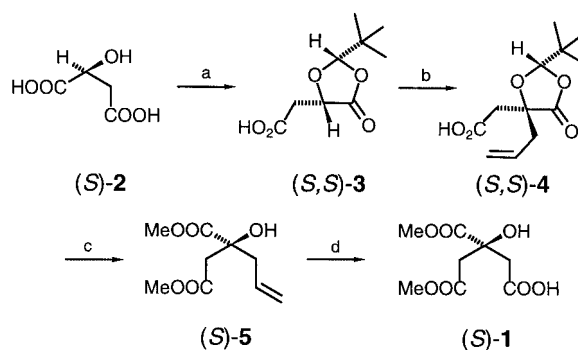


Abbildung 1. <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eines Seidenextrakts (CD<sub>3</sub>OD) von erwachsenen weiblichen *Cupiennius-salei*-Spinnen (A) sowie deren Männchen (B). Pfeile bezeichnen charakteristische Signale; e: Ethanol (Verunreinigung), s: Lösungsmittel.

zeigte Signale zweier verschiedener CH<sub>3</sub>-Gruppen und zweier unterschiedlicher CH<sub>2</sub>-Gruppen, die jeweils diastereotop H-Atome besaßen. Das Spektrum stimmt mit der Struktur des unsymmetrischen Citronensäuredimethylesters **1** überein. Dieser Ester, der unseres Wissens noch nicht als Naturstoff beschrieben worden ist, wurde dann als Racemat synthetisiert, um die Struktur zu beweisen.<sup>[6]</sup>

Der Vergleich der Spektren des synthetischen Materials und der natürlichen Verbindung wies einige Differenzen bei den chemischen Verschiebungen der CH<sub>2</sub>-Gruppen auf. Weil diese Werte vom pH-Wert abhängen und wegen der Anwesenheit von Ionen in den Extrakten wurden Mischungsexperimente durchgeführt. Eine natürliche Probe wurde mit der gleichen Menge synthetischen Materials versetzt, wobei Benzol als interner Standard verwendet wurde. Das NMR-Spektrum zeigte nur einen Satz von Signalen und bewies somit, dass der unsymmetrische Citronensäuremethylester **1** tatsächlich der Naturstoff ist.

Anschließend wurden beide Enantiomere synthetisiert, um die absolute Konfiguration des Naturstoffs zu bestimmen (Schema 1). Sowohl (*R*)- als auch (*S*)-Äpfelsäure **2** wurden



Schema 1. Synthese von (*S*)-Cupilure (*S*)-**1**: a) H<sup>+</sup>, Pivalaldehyd; b) Li-HMDS, dann CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>Br; c) 5 Äquiv. BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, MeOH; d) RuCl<sub>3</sub>, NaIO<sub>4</sub>, CCl<sub>4</sub>, MeCN, H<sub>2</sub>O. HMDS = Hexamethyldisilazanid.

[\*] Prof. Dr. S. Schulz, Dr. M. Papke  
Institut für Organische Chemie  
Technische Universität Braunschweig  
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Deutschland)  
Fax: (+49) 531-391-5272  
E-mail: stefan.schulz@tu-bs.de

Prof. Dr. H. Tichy, Mag. E. Gingl, Dr. R. Ehn  
Institut für Zoologie  
Universität Wien  
Althanstraße 14, 1090 Wien (Österreich)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung in Österreich und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

mit Pivalaldehyd in die entsprechenden Dioxolanone **3** überführt, die anschließend nach der Seebach-Methode mit Allylbromid alkyliert wurden.<sup>[7]</sup> Die so erhaltenen Allyldioxolanone **4** wiesen ein Enantiomerenverhältnis von 96:4 auf. Mit  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  in Methanol in großem Überschuss wurden in einem Schritt das Acetal gespalten und die Säuregruppen verestert. Die abschließende oxidative Spaltung der Doppelbindung in **5** mit  $\text{RuO}_4$ <sup>[8]</sup> lieferte jeweils die gewünschten Enantiomere (*R*)- und (*S*)-**1** mit hohem Enantiomerenverhältnis (96:4).

Der Vergleich des synthetischen Materials mit dem natürlichen Produkt durch Gaschromatographie an einer chiralen Phase bewies die bevorzugte (*S*)-Konfiguration (e.r. = 95:5) des natürlichen Esters (Abbildung 2). Die Trennung war erst

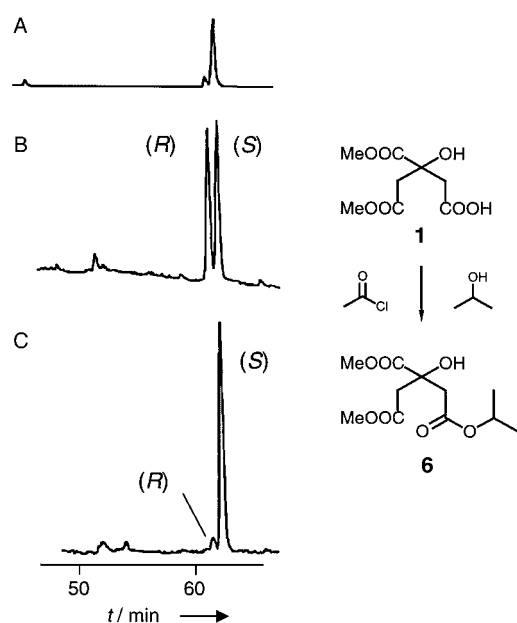


Abbildung 2. Gaschromatographische Trennung von Dimethylcitrat **1** an einer chiralen Phase (25 m, 50 % Heptakis(6-*O*-TBDMS-2,3-di-*O*-acetyl)- $\beta$ -cyclodextrin und 50 % OV1701,<sup>[10]</sup> 110 °C isotherm) nach Umwandlung in die entsprechenden Isopropylester **6**. Synthetisches (*S*)-**1** (A), *rac*-**1** (B) und natürlicher Seidenextrakt, der **1** enthält (C). Die stereochemischen Deskriptoren beziehen sich auf die Stammverbindung **1**.

nach Umwandlung von **1** in den Isopropylester **6** mit Isopropanol/Acetylchlorid möglich. Unter den Derivatisierungsbedingungen wurde das Enantiomerenverhältnis nicht verändert. Das Racemat ließ sich nur an der Cyclodextrinphase Heptakis(6-*O*-TBDMS-2,3-di-*O*-acetyl)- $\beta$ -cyclodextrin (in 50 % OV1701)<sup>[9]</sup> trennen (TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl), obwohl verschiedene andere Phasen getestet wurden.

Verhaltensexperimente mit dem synthetischen Material, das auf inaktive Seide aufgetragen wurde, bewiesen, dass (*S*)-**1** das männliche Werbungsverhalten auslöst, wohingegen das (*R*)-Enantiomer inaktiv ist.<sup>[5]</sup> Das synthetische (*S*)-**1** ermöglichte erstmals die elektrophysiologische Identifizierung eines Pheromonsensillums in einer Spinne.<sup>[5]</sup> Diese Sensillen sind Kontaktchemorezeptoren auf den Pedipalpen. Einzelzellableitungen wurden mit einem elektrolytisch geschärften Wolframdraht durchgeführt; die zweite Elektrode wurde in die Spitze einer Pedipalpe eingeführt. Die Kontaktfläche

eines einzelnen Sensillums mit dem Sicherungsfaden ist  $0.03 \mu\text{m}^2$ . Diese Fläche enthält höchstens 170 000 Pheromonmoleküle, weil sich maximal  $1 \mu\text{g}$  Pheromone von 20 m Sicherungsfaden extrahieren lassen.

Unsere Resultate der chemischen Analyse, der Elektrophysiologie der Pheromonsensillen und der Verhaltenstests zeigen eindeutig, dass **1**, für das wir den Namen Cupilure vorschlagen, ein auf der Spinnseide vorliegendes Kontaktpheromon von weiblichen *Cupiennius-salei*-Spinnen ist. Cupilure ist strukturell nicht mit anderen bekannten Pheromonen verwandt. Das einzige andere bisher bekannte Kontaktpheromon von Spinnen ist (*R,R*)-3-(3-Hydroxybutyryloxy)buttersäure, die ein Netzreduktionsverhalten der Männchen von *Linyphia triangularis* hervorruft.<sup>[3]</sup> Beide Verbindungen sind biosynthetisch sehr eng an den Primärstoffwechsel angelehnt: Cupilure kann leicht aus der überall vorkommenden Citronensäure durch doppelte Methylierung gewonnen werden, während die *Linyphia*-Verbindung ein einfaches Kondensationsprodukt von (*R*)-3-Hydroxybuttersäure ist, ein wichtiges Intermediat in der Fettsäurebiosynthese. Solche engen Verbindungen zum Primärstoffwechsel sind von Insektenpheromonen nicht bekannt. Ob dieses ein generelles Merkmal von Spinnenpheromonen ist, das ihre karnivore Lebensweise widerspiegelt, kann nur durch weitere Studien festgestellt werden. Jüngst gelang uns die Identifizierung eines flüchtigen Spinnenpheromons, dem 8-Methyl-2-nonanon, das eher den Insektenpheromonen ähnelt.<sup>[10]</sup>

Eingegangen am 27. Juni 2000 [Z15345]

- [1] W. Francke, S. Schulz in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 8 (Hrsg.: D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, K. Mori), Elsevier, Amsterdam, **1999**, S. 197–261.
- [2] W. J. Tietjen, J. S. Rovner in *Spider Communication* (Hrsg.: P. N. Witt, J. S. Rovner), Princeton University Press, Princeton, **1982**, S. 249–279; D. M. Stewart in *Endocrinology of Selected Invertebrate Types* (Hrsg.: H. Laufer, G. H. Downer), Alan R. Liss, New York, **1988**, S. 415–428; L. R. Ayyagari, W. J. Tietjen, *J. Chem. Ecol.* **1986**, *13*, 237–244; C. Roland, J. S. Rovner, *J. Arachnol.* **1983**, *11*, 77–85; R. Lizotte, J. S. Rovner, *J. Arachnol.* **1989**, *17*, 121–125; C. Roland, *J. Arachnol.* **1984**, *11*, 309–314; A. Anava, Y. Lubin, *Bull. Br. Arachnol. Soc.* **1993**, *9*, 119–122; O. Prouvost, M. Trabalon, M. Papke, S. Schulz, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1999**, *40*, 194–202; R. B. Suter, A. J. Hirscheimer, *Anim. Behav.* **1986**, *34*, 748–753; P. J. Watson, *Science* **1986**, *233*, 219–221; S. E. Riechert, F. D. Singer, *Anim. Behav.* **1995**, *49*, 719–723; J. Prenter, R. W. Elwood, W. I. Montgomery, *Behav. Ecol. Sociobiol.* **1994**, *35*, 39–43.
- [3] S. Schulz, S. Toft, *Science* **1993**, *260*, 1635–1637.
- [4] J. S. Rovner, F. G. Barth, *Science* **1981**, *214*, 464–466.
- [5] H. Tichy, E. Gingl, R. Ehn, M. Papke, S. Schulz, *J. Comp. Physiol. A*, im Druck.
- [6] Die Verseifung von Trimethylcitrat mit einem Äquivalent NaOH gab eine Mischung aus dem asymmetrischen und dem symmetrischen Dimethylester, im Widerspruch zu Literaturdaten (K. Hirota, H. Kitagawa, M. Shimamura, S. Ohmori, *Chem. Lett.* **1980**, 191–194). Weil diese Mischung nicht effektiv getrennt werden konnte, wurden die freien Säuregruppen mit Phenyl diazomethan in Benzylester umgewandelt. Nach der chromatographischen Trennung dieser Benzylester wurde die Zielverbindung durch Hydrogenolyse erhalten.
- [7] D. Seebach, R. Naef, G. Calderari, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1313–1324.
- [8] P. H. J. Carlsen, T. Katsuki, V. S. Martin, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3936–3938.
- [9] W. A. König, R. Krebber, P. Mischnick, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989**, *12*, 732–738.
- [10] M. D. Papke, S. E. Riechert, S. Schulz, *Anim. Behav.*, im Druck.