

Das Sexualpheromon der Wespenspinne *Argiope bruennichi***

Satya P. Chinta, Stephan Goller, Julia Lux, Sebastian Funke, Gabriele Uhl* und Stefan Schulz*

Die aktuelle biochemische Forschung an Spinnen konzentriert sich auf zwei charakteristische Merkmale, die Seide und die Toxine. Die chemische Kommunikation von Spinnen spielt eine zentrale Rolle bei ihrem Paarungssystem. Die Geschlechtspartner müssen sich in der Paarungssaison über größere Distanzen hinweg finden, da sie gewöhnlich solitär und räuberisch leben. Die Produktion eines flüchtigen Signals, das hilft, potenzielle Partner anzulocken, ist daher essenziell, doch sind bisher erst sehr wenige derartige Pheromone bekannt (siehe nachfolgende Zuschrift).^[1] Wir berichten hier von der ersten Identifizierung eines Pheromons von Radnetzspinnen (Araneidae) bei der Wespenspinne *Argiope bruennichi* und zeigen zum ersten Mal, dass Pheromone zur Anlockung von Spinnen im Freiland verwendet werden können.

Radnetzspinnen sind eine der erfolgreichsten Spinnenfamilien weltweit; über 2600 Arten sind bekannt. Frühe Experimente zeigten, dass *Cyrtophora cicatrosa* ein flüchtiges Pheromon emittiert, das in höheren Konzentrationen die Balz initiiert.^[2] Käfige mit Weibchen von *Araneus trifolium* und *Argiope trifasciata* lockten Männchen der eigenen Art an.^[3] Die letztere Art lockte auch *Argiope-aurantia*-Männchen an, sodass das Vorhandensein eines gemeinsamen Sexualpheromons der beiden Arten wahrscheinlich ist.^[4] Sexualpheromone, die arteilene Männchen aus einiger Entfernung zum Netz locken können, sind bisher nur von der Spinne *Agelenopsis aperta* (Agelenidae) berichtet worden, die 8-Methyl-2-nonanon verwendet.^[5]

Wir haben hier das Pheromonsystem der sehr charakteristischen Wespenspinne *Argiope bruennichi* untersucht, die auf Wiesen im Mittelmeergebiet vorkommt, in letzter Zeit aber auch in gemäßigten Zonen in Mitteleuropa zu finden ist. Die großen erwachsenen Weibchen bauen zwischen Grashalmen Netze. Diese Netze geben offenbar ein Sexualpheromon ab, das die umherwandernden Männchen anlockt. Wir berichten hier über die Identifizierung und Synthese dieses neuen Pheromons sowie über seine Aktivität im Freiland.

Flüchtige Verbindungen von weiblichen Spinnen verschiedener Entwicklungsstufen (nicht ausgewachsen, unbegattet und begattet) wurden in einer Glaskammer mithilfe eines aktivierten Kohlefilters aus dem Gasraum aufgefangen. Der Filter wurde mit Dichlormethan extrahiert und mit GC-MS untersucht. Nur in virginen, unbegatteten Spinnen wurde die Verbindung **A** gefunden; juvenile oder begattete Spinnen enthielten sie nicht (Abbildung 1).

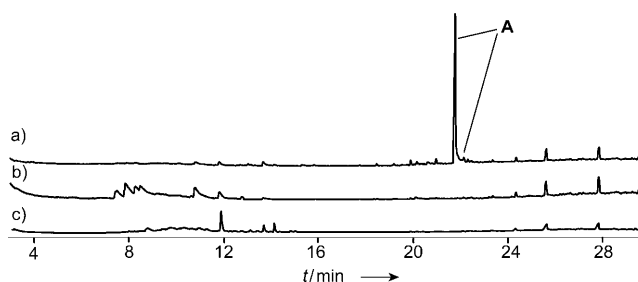


Abbildung 1. Gaschromatogramm der Headspace-Untersuchung von *Argiope bruennichi*. a) Virgines Weibchen, b) begattetes Weibchen, c) nicht ausgewachsenes Weibchen.

In Extrakten der Spinnennetze wurde wiederum nur bei den unbegatteten Spinnen die Verbindung **A** und zusätzlich eine weitere weibchenspezifische Verbindung **B** gefunden (Abbildung 2). Da **A** nur in den unbegatteten Weibchen nachgewiesen wurde, **B** dagegen nicht in allen Proben der unbegatteten Weibchen vorkam und auch in Extrakten der begatteten Weibchen auftrat, konzentrierten wir uns bei den weiteren Untersuchungen und den Freilandversuchen auf Verbindung **A**.

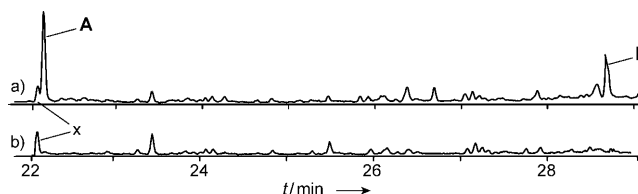


Abbildung 2. Gaschromatogramm der Seidenextrakte von *Argiope bruennichi*. a) Unbegattetes Weibchen, b) nicht ausgewachsenes Weibchen. x: Verunreinigung.

[*] S. P. Chinta, Dr. S. Goller, Prof. Dr. S. Schulz
Institut für Organische Chemie
Technische Universität Braunschweig
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Deutschland)
Fax: (+49) 531-391-5272
E-Mail: stefan.schulz@tu-bs.de
Homepage: <http://aks7.org-chem.nat.tu-bs.de/>
J. Lux, S. Funke, Prof. Dr. G. Uhl
Institut für Zoologie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Endenicher Allee 11–13, 53115 Bonn (Deutschland)
Prof. Dr. G. Uhl
Zoologisches Institut und Museum
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Anklamer Straße 20, 17489 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-864-252
E-Mail: gabriele.uhl@uni-greifswald.de
Homepage: <http://www.mnf.uni-greifswald.de/fr-biologie/zoologisches-institut-museum/allgemeine-und-systematische-zoologie.html>

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.
Hintergrundinformationen (experimentelle Details) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200906311> zu finden.

Das Massenspektrum von **A** sieht dem von Trimethylcitrat (Abbildung 3) sehr ähnlich. Eine Verschiebung der Masse aller wichtigen Fragment-Ionen um 14 Masseneinheiten

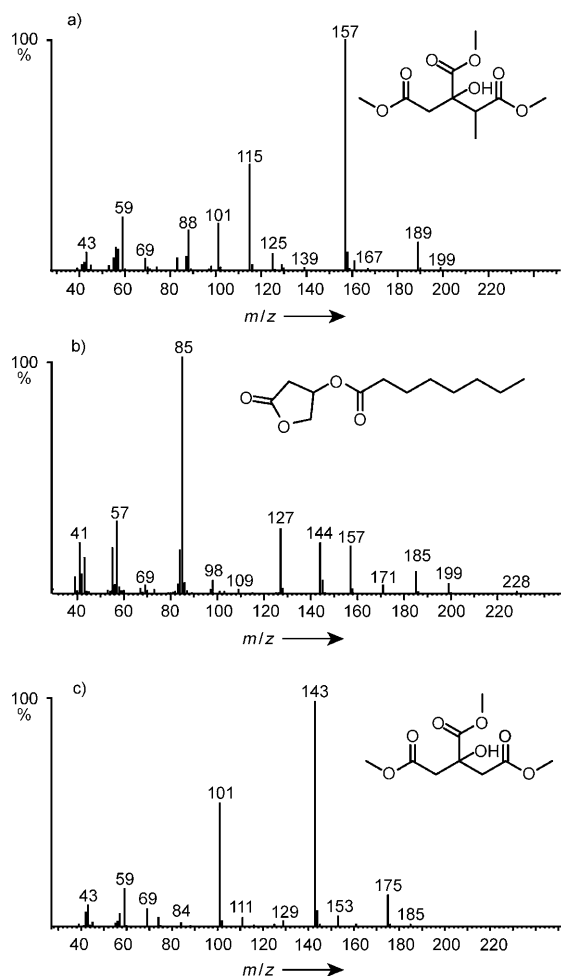


Abbildung 3. Massenspektren von a) Methylcitronensäuretrimethylester (**A**), b) 3-Octanoyloxy-4-butanolid (**B**), c) Citronensäuretrimethylester.

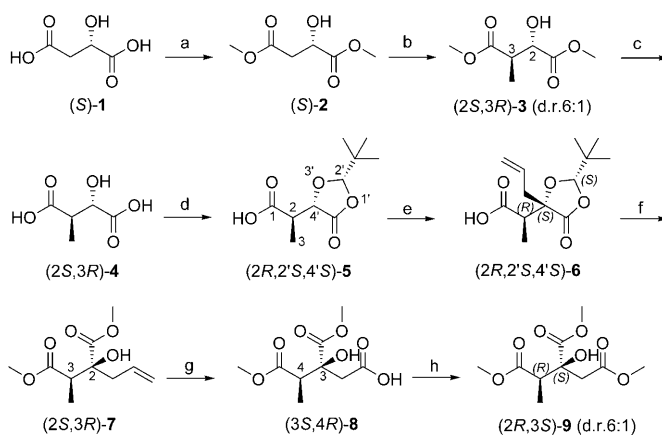
ten lässt auf die Gegenwart einer zusätzlichen CH_2 -Gruppe an unbekannter Position schließen. Die Derivatisierung von **A** mit MSTFA (*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid) weist auf das Vorhandensein eines labilen H-Atoms und eine Molekülmasse von m/z 248 hin. Da die gemischten Ethyl-/Methylester der Citronensäure stark abweichende Massenspektren aufwiesen, bleiben nur zwei mögliche Strukturen mit einem zusätzlichen Kohlenstoffatom übrig. Die eine ist das zusätzlich an einer CH_2 -Gruppe methylierte Trimethylcitrat und die andere das Isomer mit einer um eine Einheit verlängerten Kohlenstoffkette, die aber als biosynthetisch unwahrscheinlich ausgeschlossen wurde.

Das Massenspektrum von **A** lässt sich gut mit der Struktur von Methylcitronensäuretrimethylester in Einklang bringen und ist eng mit dem von Trimethylcitrat verwandt. Eine α -Spaltung der Methoxycarbonylgruppe führt zu dem Fragment-Ion mit m/z 189. Eine Eliminierung von Methanol ergibt das Basis-Ion mit m/z 157. Die Ionen mit m/z 101 und

m/z 115 entstehen aus der Eliminierung von Methylacetat (74 amu) und Methylpropionat (88 amu) nach McLafferty-Umlagerung (Abbildung 3).

A kommt in allen Extrakten von virginen Weibchen in einem Diastereomerenverhältnis von 6:1 bis 25:1 vor. Für das Hauptdiastereomer wurde auf einer unpolaren GC-Phase ein Retentionsindex (RI) von 1518, für das Nebendiastereomer ein RI von 1527 ermittelt. Für die Aufklärung der absoluten Konfiguration des Naturstoffes und für die Bereitstellung von Material für Biotests war es nötig, alle Stereoisomere des Methylcitronensäuretrimethylesters zu synthetisieren. Es ist allgemein bekannt, dass Stereospezifität bei Pheromonen eine entscheidende Rolle spielt,^[6] da die Gegenwart des nichtnatürlichen Stereoisomers die Wirkung eines Pheromons unterdrücken kann (siehe nachfolgende Zuschrift).^[1]

Als chirale Ausgangsverbindung für die Synthese wurde (*S*)-Äpfelsäure (**1**) gewählt (Schema 1). Nach Umwandlung in den Methylester **2** ergab eine Methylierung unter Ver-



Schema 1. Synthese von (2*R*,3*S*)-Methylcitronensäuretrimethylester (**9**). a) HCl, MeOH, 80 °C; b) LDA, MeI, –78 °C; c) 2 *N* KOH, THF/MeOH (1:1); d) H_2SO_4 , Pivalaldehyd; e) LHMDS, –78 °C, Allylbromid; f) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, MeOH; g) RuCl_3 , NaIO_4 , CCl_4 , MeCN, H_2O ; h) EDC, MeOH. EDC = *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid, LDA = Lithiumdiisopropylamid, LHMDS = Lithiumhexamethyldisilazid.

wendung von LDA^[7] den methylierten Äpfelsäuredimethylester **3** in einem Diastereomengemisch von 6:1 zugunsten des 2*S*,3*R*-Isomers.^[8] Durch Esterhydrolyse von **3** wurde die entsprechende Säure **4**^[9] erhalten, die im nächsten Schritt mit Pivalaldehyd in das thermodynamisch bevorzugte *cis*-Dioxolanon **5**^[10] überführt wurde. Die Alkylierung mit Allylbromid nach der chiralen Relais-Methode von Seebach et al.^[11] ergab die Zwischenstufe **6**. Eine nachfolgende Umsetzung mit $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ in Methanol führte zur Abspaltung der Acetalgruppe bei gleichzeitiger Veresterung der Säure, sodass **7** erhalten wurde. Durch oxidative Spaltung von **7** mit RuO_4 wurde die Säure **8** erhalten,^[12,13] die nachfolgend mit Methanol zum (2*R*,3*S*)-Methylcitronensäuretrimethylester verestert wurde.^[14] Da die Seebach-Methode^[11] hoch stereoselektiv ist, konnte dem als Nebenprodukt gebildeten Stereoisomer die 2*S*,3*S*-Konfiguration zugewiesen werden. Das Hauptstereo-

somer weist sowohl das gleiche Massenspektrum als auch die gleiche gaschromatographische Retentionszeit wie die Hauptkomponente des natürlichen Extrakts auf.

Zur Aufklärung der absoluten Konfiguration des Naturstoffes wurde die Gaschromatographie an chiralen Phasen verwendet. Die teilweise Trennung der vier Enantiomere des Methylcitronensäuretrimethylesters war auf einer chiralen Hydrodex-6-TBDMS-Säule möglich (TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl; Abbildung 4). Die Analyse des natürlichen

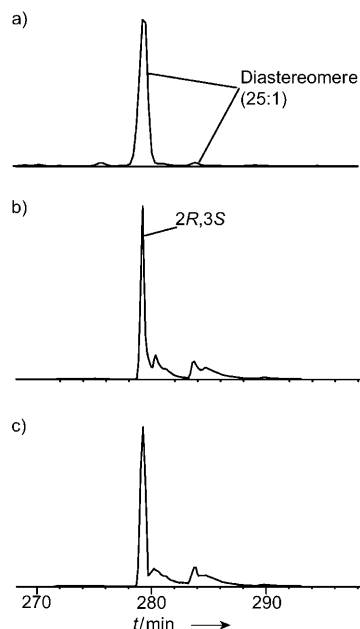


Abbildung 4. Gaschromatographische Trennung von Methylcitronensäuretrimethylester an einer chiralen Hydrodex-6-TBDMS-Phase. Temperaturprogramm: 50 °C für 5 min, dann mit 0,2 °C min⁻¹ auf 200 °C. a) Natürlicher Extrakt, b) synthetisches **9**, c) Koinjektion.

Extrakts zeigte, dass es sich bei den beiden in der Natur vorkommenden Verbindungen um die 2*R*,3*S*- und 2*S*,3*S*-Isomere handelte, die in einem Verhältnis von 6:1 bis 25:1 vorkommen. Das Hauptisomer im Extrakt war der (2*R*,3*S*)-Methylcitronensäuretrimethylester, ebenfalls Hauptprodukt der Synthese, und das Nebenisomer das 2*S*,3*S*-Isomer, ebenso Nebenprodukt der Synthese. Das Massenspektrum von **B** (Abbildung 3) wies ein Molekül-Ion mit *m/z* 228 auf. Es wird durch das Ion mit *m/z* 85 dominiert, das charakteristisch für einen Butyrolactonring ist. Das Auftreten der anderen charakteristischen Ionen mit *m/z* 127 (Octanoyl-Rest), 144 (McLafferty-Umlagerungsprodukt) und 157 (β -Spaltung zur Carbonylgruppe) und ein Vergleich mit einem Referenzspektrum der synthetischen Verbindung führten dazu, dass Verbindung **B** als 3-Octanoyloxy- γ -butyrolacton identifiziert werden konnte.

Die synthetische 6:1-Mischung von (2*R*,3*S*)- und (2*S*,3*S*)-Methylcitronensäuretrimethylester wurde in Freilandversuchen auf biologische Aktivität untersucht. Dreifußfallen mit der Methylcitronensäuretrimethylester-Mischung und einer Kontrolle wurden während einer heißen und trockenen Sommerperiode auf einer offenen Wiese aufgestellt. Die ge-

testete Verbindung wirkte stark anziehend auf Männchen von *A. bruennichi*. Während einer je 30-minütigen Testperiode wurden insgesamt 34 Männchen zu 10 Fallen gelockt, die jeweils mit 25 μ g Substanz beladen waren. Diese Männchen zeigten typisches Balzverhalten, wie das Spinnen von Seidenfäden von der Falle zu benachbarten Pflanzen und das Zucken und Vibrieren des Hinterleibs. Die Kontrollfallen wurden nie von Männchen aufgesucht. Die Pheromonwirkung scheint mit sinkender Konzentration abzunehmen, allerdings konnte bei einer Beladung mit 1 μ g noch eine Wirkung beobachtet werden (Tabelle 1). In Konkurrenzexperi-

Tabelle 1: Ergebnisse der Freilandversuche.^[a]

Menge [μ g]	Testfallen	erfolgreiche Tests [%]	angelockte Männchen
25.00	10	10 (100)	34
12.50	10	8 (80)	19
2.25	5	3 (60)	7
1.25	10	5 (50)	6
0.625	4	4 (100)	5
0.30	10	4 (40)	4
0.15	7	1 (14)	1

[a] Fallen, die unterschiedliche Mengen der 6:1-Mischung von (2*R*,3*S*)- und (2*S*,3*S*)-Methylcitronensäuretrimethylester (**9**) enthalten, wurden gegen Fallen, die nur mit Dichlormethan als Kontrolle beladen waren, getestet. Die Zahl der Testfallen, die Zahl der erfolgreichen Anlockungen und die Gesamtzahl der angelockten Männchen sind angegeben. Die Kontrollfallen zeigten keine Anlockung.

menten wurde gezeigt, dass höhere Konzentrationen wirksamer sind als geringere (siehe Experiment 2 in den Hintergrundinformationen). Außerdem wurde der Einfluss des Verhältnisses der beiden Enantiomere in der Mischung untersucht. Mischungen im Verhältnis 6:1 und 2:1 von (2*R*,3*S*)- und (2*S*,3*S*)-Methylcitronensäuretrimethylester erwiesen sich als gleich wirksam für die Spinnen (siehe Experiment 3 in den Hintergrundinformationen).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Methylcitronensäuretrimethylester das Sexualpheromon der weiblichen *Argiope-bruennichi*-Spinnen ist und Männchen anlockt. Die Verbindung ist strukturell eng mit dem Sexualpheromon der Weibchen der tropischen Jagdspinne *Cupiennius salei* verwandt,^[15] dem unsymmetrischen (*S*)-Dimethylcitrat, das das Balzverhalten der Männchen induziert. In unserer Arbeit wurde zum ersten Mal die Anlockung von Spinnen mithilfe von Pheromonfallen im Freiland gezeigt. 8-Methyl-2-nonanon, das Sexualpheromon von *Agelopsis aperta*,^[5] ist das bisher einzige andere bekannte leichtflüchtige Spinnenpheromon. Methylcitronensäure kommt in der Natur in vielen Organismen vor, wobei die 2*R*,3*S*- und 2*S*,3*S*-Isomere in Schweinen und Menschen von der *si*-Citrat-Synthase gebildet werden.^[16] Die anderen zwei Isomere werden in Bakterien und Hefen durch die *re*-Citrat-Synthase gebildet.^[17] Die Verwendung eines Derivats der Citronensäure, eines typischen Primärmetaboliten, als Pheromon wurde bislang in anderen Tieren noch nicht beobachtet. Ob die enge Verbindung zwischen den Primärmetaboliten und den Pheromonen für Spinnen typisch ist, muss zukünftig geklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Sexualpheromon der Wespenspinne *Argiope bruennichi* als eine Mischung von (2*R*,3*S*)- und (2*S*,3*S*)-Methylcitronensäuretrimethylester identifiziert und synthetisiert werden. In Freilandversuchen konnten wir zeigen, dass dieses Pheromon in Abhängigkeit von seiner Konzentration männliche Spinnen anlockt. Eine weitere weibchenspezifische Komponente, das 3-Octanoyl-oxy- γ -butyrolacton, konnte identifiziert werden, aber seine Funktion muss noch geklärt werden.

Eingegangen am 9. November 2009

Online veröffentlicht am 12. Februar 2010

Stichwörter: Araneae · Chemische Kommunikation · Naturstoffe · Partner-Anlockung · Pheromone

-
- [1] E. Jerhot, J. A. Stoltz, M. C. B. Andrade, S. Schulz, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2081–2084; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2037–2040.
 - [2] R. Blanke, *Naturwissenschaften* **1973**, 60, 481.
 - [3] C. W. Olive, *J. Arachnol.* **1982**, 10, 241–245.
 - [4] F. Enders, *Br. Arachnol. Soc. News* **1975**, 13, 5–6.
 - [5] M. D. Papke, S. E. Riechert, S. Schulz, *Anim. Behav.* **2001**, 61, 877–886.
 - [6] K. Mori, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 7505–7523.
 - [7] J. L. Herrmann, R. H. Schlessinger, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, 711–712.
 - [8] P. Wipf, Y. Uto, S. Yoshimura, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 1670–1681.
 - [9] I. T. Lim, S. O. Meroueh, M. Lee, M. J. Heeg, S. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10271–10277.
 - [10] S. A. A. El Bialy, H. Braun, L. F. Tietze, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2965–2972.
 - [11] D. Seebach, R. Naef, G. Calderari, *Tetrahedron* **1984**, 40, 1313–1324.
 - [12] P. H. J. Carlsen, T. Katsuki, V. S. Martin, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 3936–3938.
 - [13] B. E. Rossiter, T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 464–465.
 - [14] J. Patel, J. C. Hoyt, R. J. Parry, *Tetrahedron* **1998**, 54, 15927–15936.
 - [15] H. Tichy, E. Gingl, R. Ehn, M. Papke, S. Schulz, *J. Comp. Physiol. A* **2001**, 187, 75–78.
 - [16] F. Podebrad, M. Heil, A. Scharrer, S. Feldmer, O. Schulte-Mäter, A. Mosandl, A. C. Sewell, H. J. Böhles, *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, 604–608; S. Brandänge, S. Josephson, A. Mahlen, L. Mörch, L. Sweetman, S. Vallen, *Acta Chem. Scand. Ser. B* **1977**, 31, 628–630.
 - [17] G. Gottschalk, A. H. Barker, *Biochemistry* **1967**, 6, 1027–1034; T. Tabuchi, N. Serizawa, S. Ohmomo, *Agric. Biol. Chem.* **1974**, 38, 2565–2566.
-