

# Acylierte Serinderivate: eine einzigartige Klasse von Arthropoden-Pheromonen der Australischen Rotrückenspinne *Latrodectus hasselti*\*\*

Elena Jerhot, Jeffrey A. Stoltz, Maydianne C. B. Andrade und Stefan Schulz\*

Spinnen sind von großer ökologischer Bedeutung, da sie wichtige Fressfeinde terrestrischer Insekten sind. Während der Balz nutzen viele Arten außer anderen Reizen die chemische Kommunikation. Diese ist bei Spinnen jedoch kaum erforscht, besonders im Vergleich mit anderen Arthropoden wie Insekten oder Milben. Typischerweise verwenden Spinnen Seide für unterschiedliche Aufgaben. Partneranziehung, Initiierung der Balz und andere wichtige Aspekte der Spinnenfortpflanzung werden offenbar von Pheromonen ausgelöst, die sich auf der Seide oder auf dem Körper der weiblichen Spinne befinden.<sup>[1,2]</sup> Fast alle der wenigen bisher identifizierten Spinnenpheromone unterscheiden sich strukturell von bekannten Insektenpheromonen. Hier berichten wir von der Identifizierung des ungewöhnlichen Methylesters von *N*-3-Methylbutyryl-*O*-(*S*)-2-methylbutyryl-L-serin (**3**) als ein Sexualpheromon der Weibchen der Australischen Rotrückenspinne *Latrodectus hasselti*. Diese Verbindung zählt zu einer neuen Klasse von Sekundärmetaboliten: N,O-diacylierten Serin-Derivaten.

Trotz vieler Berichte über die Bedeutung der chemischen Kommunikation bei Spinnen<sup>[1]</sup> gelang bisher nur die Identifizierung von fünf Spinnenpheromonen. Das Estolid von zwei (*R*)-3-Hydroxybuttersäure-Einheiten, (*R,R*)-3-(3-Hydroxybutyryloxy)buttersäure, induziert das Netzabbauverhalten der Männchen von *Linyphia triangularis* (Linyphiidae).<sup>[3]</sup> Das *S*-Enantiomer der asymmetrischen Dimethylcitronensäure löst bei den Männchen der Amerikanischen Wanderspinne *Cupiennius salei* Werbeverhalten aus.<sup>[4]</sup> 8-Methyl-2-nonanon, das von den Weibchen der Wüstenspinne *Agenelopsis aperta* abgesondert wird, zieht die Männchen an und induziert auch die Balz.<sup>[5]</sup> Weiter wurde berichtet, dass ein Gemisch von

Fettsäuren bei der großen Winkelspinne *Tegenaria atrica*<sup>[6,7]</sup> als Sexualpheromon fungiert, während (*E,E*)-Farnesylacetat und Hexadecylacetat als Pheromone bei *Pholcus beijingensis* identifiziert wurden.<sup>[8]</sup>

Die Echten Witwen (*Latrodectus*, Theridiidae) sind von besonderem Interesse für Menschen, da sie unter anderem neurotoxische Gifte produzieren,<sup>[9]</sup> aber auch oft in räumlicher Nähe zu Menschen leben. Verhaltensbeobachtungen haben ergeben, dass die Netze der weiblichen Witwen Pheromone enthalten, die die Männchen anziehen, die Balz auslösen und die Unterscheidung des Fortpflanzungsstatus des Weibchens, seiner Herkunftspopulation und seiner Art ermöglichen.<sup>[10–14]</sup> Beispielsweise werden die Männchen von *L. hesperus* und *L. hasselti* durch flüchtige Signalstoffe zum Netz der Weibchen gelockt.<sup>[11,12]</sup>

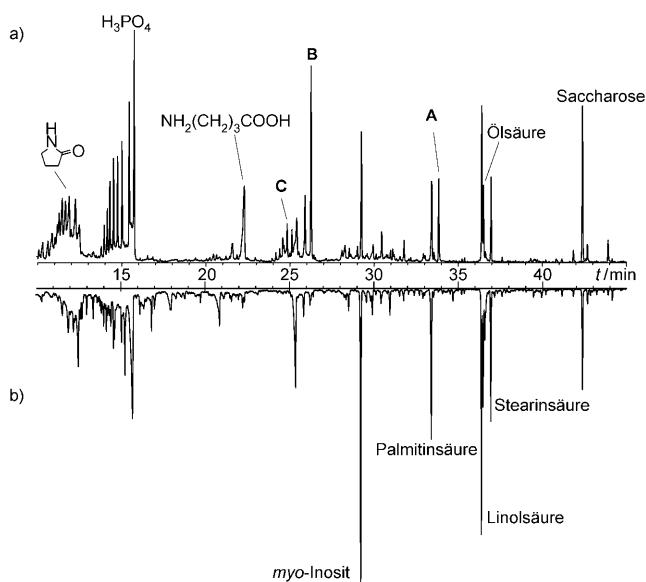
*L.-hasselti*-Männchen zeigen Balzverhalten auf Netzen von erwachsenen virginen Weibchen, während Netze, die von einem begatteten Weibchen, von Jungtieren oder von Männchen gebaut wurden, keine Reaktion hervorrufen.<sup>[14]</sup> Experimente haben ergeben, dass unbegattete Weibchen ein Pheromon auf das Netz aufbringen. Diese Verbindung kann mit Methanol extrahiert werden und bei Auftragen auf ein in der Nähe befindliches Filterpapier Such- und Balzverhalten bei Männchen hervorrufen.<sup>[14]</sup> Aus diesem Grund waren wir an der Identifizierung des Balz-induzierenden Pheromons interessiert.

Seide von unbegatteten (aktiv) und begatteten (inaktiv) Weibchen wurde während einiger Wochen gesammelt und mit Methanol extrahiert. Beide Extrakte wurden analysiert, um die spezifischen Verbindungen der aktiven Seide, die potenziellen Pheromonkandidaten, zu identifizieren. Nach Derivatisierung mit *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) zur Verdampfung polarer Verbindungen wurden die Extrakte mit GC-MS analysiert (Abbildung 1). Dieses Verfahren ermöglicht einen relativ breiten Überblick über die vorhandenen Verbindungen auf der Seide. Während einige Lipide, Kohlenhydrate, Aminosäuren und Säuren in beiden Arten von Seiden vorkamen, gab es zwei Verbindungen, **A** und **B**, die spezifisch für Extrakte der aktiven Seide waren. Die Analyse des Massenspektrums und ein Vergleich mit einer synthetischen Probe ergaben, dass es sich bei **A** um *N*-Acetyl-dopamin (**4**) handelt. **B** wies ein ungewöhnliches Massenspektrum auf (Abbildung 2). Es enthielt keine Trimethylsilylgruppen, ein Anzeichen für das Fehlen von jeglicher Hydroxy-, Amino- oder Säuregruppe. Zusätzliche Analysen mit GC-CI-MS und hoch auflösender GC-MS belegten, dass das Molekülion einen *m/z*-Wert von 287.1754 aufweist, was in Einklang mit der Summenformel  $C_{14}H_{25}N_1O_5$  (ber.

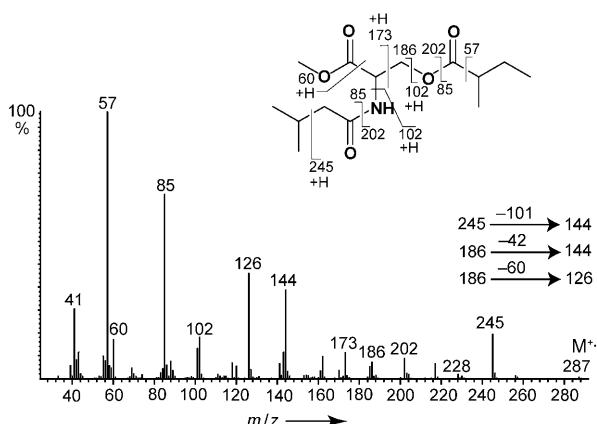
[\*] E. Jerhot, Prof. Dr. S. Schulz  
Institut für Organische Chemie  
Technische Universität Braunschweig  
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Deutschland)  
Fax: (+49) 531-391-5272  
E-Mail: stefan.schulz@tu-bs.de  
Homepage: <http://aks7.org-chem.nat.tu-bs.de/>  
J. A. Stoltz, Prof. Dr. M. C. B. Andrade  
Integrative Behaviour and Neuroscience Group  
University of Toronto Scarborough  
Toronto, Ontario, M1C 1A4 (Kanada)

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und dem Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada gefördert.

 Hintergrundinformationen (experimentelle Details) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200906312> zu finden.



**Abbildung 1.** Gaschromatogramme der Methanolextrakte von *Latrodectus hasselti*-Seide nach Trimethylsilylierung mit MSTFA. a) Seide von virginen Weibchen, b) Seide von begatteten Weibchen.



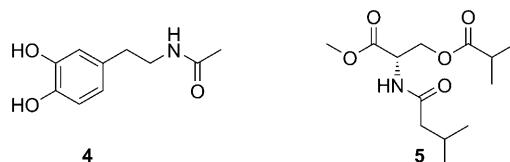
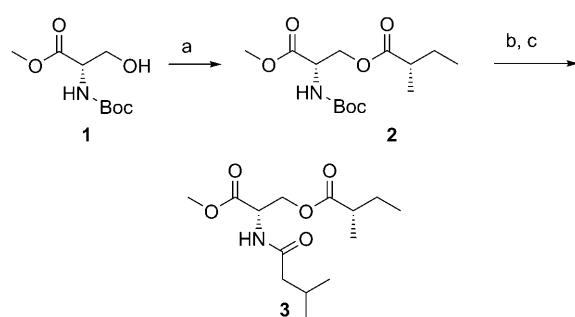
**Abbildung 2.** Massenspektrum und Fragmentierungsschema des Methylesters von N-3-Methylbutyryl-O-2-methylbutyryl-L-serin (3), einem Seidenbestandteil juveniler Weibchen von *Latrodectus hasselti*.

HR-MS 287.1733) mit drei Doppelbindungsäquivalenten ist. Die Fragmente mit  $m/z$  57 ( $C_4H_9$ ) und 85 ( $C_5H_9O_1$ ) ließen auf das Vorhandensein einer Pentanoylgruppe schließen. Diese Gruppe schien zweimal vorzukommen, einmal gebunden an ein Sauerstoffatom und einmal an ein Stickstoffatom, da zwei Ionen mit  $m/z$  102 gefunden wurden: 102.05658 entsprechend  $C_5H_{10}O_2$  (ber. 102.06808) und 102.09259 entsprechend  $C_5H_{12}N_1O_1$  (ber. 102.09188). Das Ion mit  $m/z$  60 ( $C_2H_4O_2$ ) sowie die kleinen Ionen  $[M-32]^+$  und  $[M-59]^+$  deuteten das Vorliegen einer Methylestergruppe an. Extrakte beider Seidenarten wurden NMR-spektroskopisch analysiert. In den Spektren zeigten sich viele Signale, ein  $CO-CH(NH)-CH_2$ -Spinsystem war jedoch nur bei der aktiven Seide zu sehen (siehe die Hintergrundinformationen). Die MS- und NMR-

Daten stimmten mit einem Serinmethylester überein, der am O- und am N-Atom mit einer Pentanoylgruppe acyliert ist.

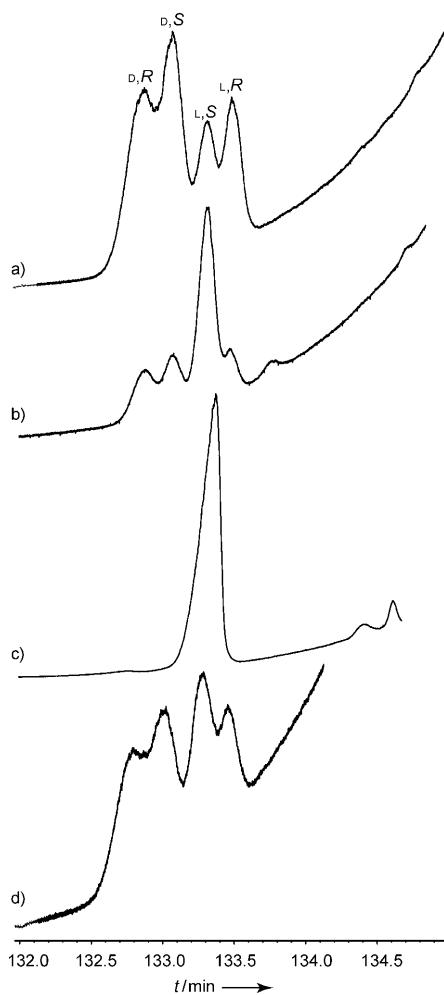
Zur Verifizierung dieses Vorschlags wurde Serinmethyl-ester mit einem Gemisch aus Pentansäure, 2-Methylbuttersäure, 3-Methylbuttersäure und Pivalinsäure acyliert, den vier möglichen C<sub>5</sub>-Säureisomeren. Ein gebildetes Produkt war in seinem Massenspektrum und seiner gaschromatographischen Retentionszeit identisch mit dem Naturstoff, was unseren ersten Strukturvorschlag bestätigte. Nach der Synthese einiger Strukturisomere stellte sich heraus, dass es sich beim gesuchten Naturstoff um *N*-3-Methylbutyryl-*O*-2-methylbutyrylserinmethylester (**3**) handelt, da diese Verbindung identische analytische Daten zum Naturstoff aufwies. **3** ist ein ungewöhnliches, unsymmetrisches, N,O-acyliertes Serin-Derivat, über das bisher noch nicht als Naturstoff berichtet wurde. Zusätzlich waren kleinere Mengen des verwandten *N*-3-Methylbutyryl-*O*-methylpropanoylserinmethylesters (**5**, Verbindung **C** in Abbildung 1) in der aktiven Seide vorhanden.

Einige Enantiomere von **3** wurden anschließend synthetisiert, um ihre biologische Aktivität zu ermitteln. Der *tert*-Butoxycarbonyl-geschützte L-Serinmethylester (**1**) wurde mit (*S*)-2-Methylbuttersäure acyliert. Nach Entfernen der Schutzgruppe wurde die 3-Methylbutyrylseitenkette durch 3-Methylbuttersäurechlorid (Schema 1) eingeführt. Auf gleiche Weise wurden einige andere Enantiomere und Diastereomere synthetisiert.



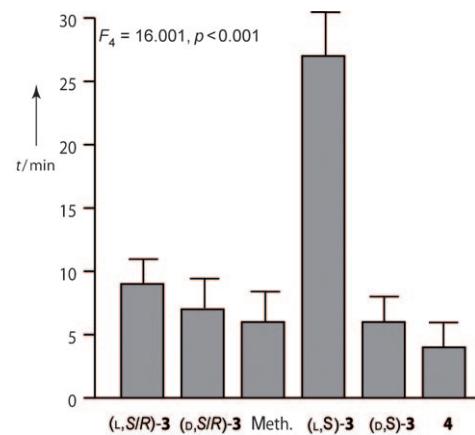
**Schema 1.** Synthese von **3** und Strukturen von anderen netzspezifischen Verbindungen der Weibchen. a)  $(S)$ -CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)COCl, DMAP; b) CF<sub>3</sub>COOH, c) CH<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>COCl, DMAP. DMAP = 4-Dimethylaminopyridin

Die absolute Konfiguration des von der Spinne produzierten Naturstoffs **3** wurde durch Gaschromatographie an einer chiralen Phase aufgeklärt. Alle vier Enantiomere konnten auf einer Lipodex-Säule teilweise getrennt werden. Nur das *L,S*-Enantiomer wird von der Spinne produziert (Abbildung 3). Diese Konfiguration war zu erwarten, da sie in Serin und natürlicher 2-Methylbuttersäure, die biosynthetisch aus Isoleucin gebildet wird, vorkommt.



**Abbildung 3.** Gaschromatogramme von natürlich auftretendem **3** und synthetischen Referenzverbindungen auf einer chiralen Lipodex-G-Säule. a) Alle Stereoisomere von **3**, b) Koinjektion von  $(L,S)$ -**3** und allen Stereoisomeren, c) natürliche Probe von **3**, d) Koinjektion der natürlichen Probe und aller Stereoisomeren.

Ein von uns entwickelter Biotest<sup>[14]</sup> wurde verwendet, um die Aktivität der synthetisierten Verbindungen mit Männchen von *L. hasselti* zu testen. *N*-Acetyl-dopamin (**4**) erwies sich als inaktiv, da sich kein Unterschied im Interesse der Männchen zum Lösungsmittel als Referenzprobe beobachten ließ. Dagegen lösten 100  $\mu$ g des  $L,S$ -Esters **3** hohe Aktivitäten der Männchen aus. Die Aktivität war abhängig von der Molekülkonfiguration: Nur die  $L,S$ -Verbindung initiierte eine Reaktion der Männchen, während alle anderen getesteten Isomere ignoriert wurden (Abbildung 4). Die korrekte Konfiguration sowohl im Aminosäure- als auch im Methylbuttersäureteil ist offensichtlich sehr wichtig, um eine positive Reaktion zu erhalten. Auch ein Gemisch der Seitenketten-epimere  $(L,S)$ -**3** und  $(L,R)$ -**3** ( $(L,S/R)$ -**3**) ist nicht aktiv. Diese Beobachtung könnte zeigen, dass ein falsches Stereoisomer die positive Reaktion des Männchens verhindert, ein Phänomen, das bisher nicht bei Spinnen beobachtet wurde, aber wiederholt bei Insekten.<sup>[15]</sup> Die Mindestmenge zum Hervorrufen einer Reaktion in unserem Test betrug 25  $\mu$ g  $(L,S)$ -**3**, während 1  $\mu$ g inaktiv war (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).



**Abbildung 4.** Biotest-Ergebnisse. Zeit, die die Männchen mit Suchen und Werben auf Filterpapier verwenden, das mit 100  $\mu$ L einer  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  Lösung der Testverbindungen behandelt worden ist. Meth.: Methanol, Lösungsmittel.

Wir haben hier das erste von einer Aminosäure abgeleitete Sexualpheromon aus Spinnen beschrieben, *N*-3-Methylbutyryl-*O*-(*S*)-2-methylbutyryl-*L*-serinmethylester (**3**). Dieses Pheromon definiert zusammen mit **5** eine neue Klasse von Naturstoffen, *N,O*-bisacylierten Serinderivaten. Die einzigen anderen bekannten Aminosäurepheromone sind die Methylester von Valin, Leucin und Isoleucin, die nur aus einer InsektenGattung, den Blatthornkäfern *Phyllophaga* spp., bekannt sind.<sup>[16-18]</sup> Der Gebrauch von Aminosäurederivaten als Sexualpheromonen kann wichtige Konsequenzen für die Evolution der sexuellen Kommunikation in diesen Arten haben. Ursprünglich wurde angenommen, dass die Pheromonproduktion nur wenige physiologische Kosten für die meisten Insekten mit sich bringt, obwohl dieser Aufwand für die Aufrechterhaltung eines verlässlichen Signals während der Evolution entscheidend ist.<sup>[19]</sup> Diese Ansicht wurde kürzlich infrage gestellt, aber es gibt nur wenige Beispiele für eine kostenintensive Pheromonproduktion.<sup>[20,21]</sup> Die Produktionskosten von Aminosäure-abgeleiteten Pheromonen, wie dem hier identifizierten, könnten mithilfe anderer physiologischer Prozesse gedeckt werden. Zukünftige Studien zur Produktion dieser neuen Pheromonklasse sollten in diesem Zusammenhang sehr aufschlussreich sein.

Vier der sieben nun bekannten Pheromone von Spinnen sind biosynthetisch nah verwandt mit Primärmetaboliten wie Aminosäuren (**3**), Citronensäure (Cupilure<sup>[4]</sup> und der im vorhergehenden Artikel identifizierte Methylcitronensäure-trimethylester)<sup>[22]</sup> oder 3-Hydroxybuttersäure (Fettsäuremetabolismus), während ein Pheromon ein Gemisch von Fettsäuren ist und der Rest eher typischen Insektenpheromonen ähnelt. Bislang ist es noch zu früh, generell festzustellen, dass Spinnen bevorzugt Pheromone aus Primärmetaboliten herstellen, doch sollte diese Frage durch weitere Untersuchungen zur Struktur und Biosynthese von Spinnenpheromonen geklärt werden können.

Eingegangen am 9. November 2009  
Online veröffentlicht am 9. Februar 2010

**Stichwörter:** Aminosäuren · Arachnida · Chemische Kommunikation · Pheromone

- 
- [1] S. Schulz in *Advances in Chemical Ecology* (Hrsg.: R. T. Cardé, J. G. Millar), Cambridge University Press, Cambridge, **2004**, S. 110–150.
  - [2] A. C. Gaskell, *Biol. Rev.* **2007**, *82*, 27–48.
  - [3] S. Schulz, S. Toft, *Science* **1993**, *260*, 1635–1637.
  - [4] M. Papke, S. Schulz, H. Tichy, E. Gingl, R. Ehn, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4517–4518; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4339–4341.
  - [5] M. D. Papke, S. E. Riechert, S. Schulz, *Anim. Behav.* **2001**, *61*, 877–886.
  - [6] M. Trabalon, J. Niogret, C. Legrand-Frossi, *Gen. Comp. Endocrinol.* **2005**, *144*, 60–66.
  - [7] O. Prouvost, M. Trabalon, M. Papke, S. Schulz, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1999**, *40*, 194–202.
  - [8] Y. Xiao, J. Zhang, S. Li, *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 769–778.
  - [9] E. V. Orlova, M. Atiqur Rahman, B. Gowen, K. E. Volynski, A. C. Ashton, C. Manser, M. van Heel, Y. A. Ushkaryov, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 48–53.
  - [10] K. Ross, R. L. Smith, *J. Arachnol.* **1979**, *7*, 69–77.
  - [11] A. Anava, Y. Lubin, *Bull. Br. Arachnol. Soc.* **1993**, *9*, 119–122.
  - [12] M. M. Kasumovic, M. C. B. Andrade, *Can. J. Zool.* **2004**, *82*, 1027–1034.
  - [13] M. C. B. Andrade, M. M. Kasumovic, *Integr. Comp. Biol.* **2005**, *45*, 838–847.
  - [14] J. A. Stoltz, J. N. McNeil, M. C. B. Andrade, *Anim. Behav.* **2007**, *74*, 1669–1674.
  - [15] K. Mori, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7505–7523.
  - [16] A. Zhang, P. S. Robbins, W. S. Leal, C. E. Linn, M. G. Villani, W. L. Roelofs, *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 231–245.
  - [17] P. Robbins, S. Nojima, S. Polavarapu, A. Koppenhöfer, C. Rodriguez-Saona, R. Holdcraft, N. Consolie, D. Peck, W. Roelofs, *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 336–341.
  - [18] W. S. Leal, A. C. Oehlschlager, P. H. G. Zarbin, E. Hidalgo, P. J. Shannon, Y. Murata, L. Gonzalez, R. Andrade, M. Ono, *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 15–25.
  - [19] R. T. Cardé, T. C. Baker in *Chemical Ecology of Insects* (Hrsg.: W. J. Bell, R. T. Cardé), Chapman & Hall, London, **1984**, S. 355–383.
  - [20] J. A. Byers, *Naturwissenschaften* **2005**, *92*, 69–72.
  - [21] B. G. Johansson, T. M. Jones, F. Widemo, *Anim. Behav.* **2005**, *69*, 851–858.
  - [22] S. P. Chinta, S. Goller, J. Lux, S. Funke, G. Uhl, S. Schulz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2077–2080; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2033–2036.