

Flüchtige Pheromone aus Amphibien: Makrolide von Fröschen der Familie Mantellidae aus Madagaskar

Dennis Poth, Katharina C. Wollenberg, Miguel Vences* und Stefan Schulz*

Froschlurche (Anura) kommunizieren hauptsächlich über akustische, optische und taktile Signale. Doch auch Anuren und andere Amphibien nutzen Pheromone.^[1,2] In einigen Fällen wurden diese schon chemisch charakterisiert; in Fröschen, Molchen und Salamandern handelt es sich um Peptide oder Proteine, die sich leicht in Wasser lösen oder sich auf der Wasseroberfläche ausbreiten können.^[2,3] Diese Verbindungen werden von Männchen genutzt, um Weibchen im Wasser anzulocken. Ein Beispiel ist das 25 Aminosäuren große Peptid Splendipherin, welches vom Australischen Baumfrosch (*Litoria splendida*) benutzt wird.^[4] Salamander benutzen Proteine als Balzpheromone, wie beispielsweise für den Rotbeinsalamander (*Plethodon shermani*) und verwandte Arten gezeigt wurde.^[5] Kürzlich wurde das Sexualpheromon des weiblichen Koreanischen Salamanders (*Hynobius leechii*) als Prostaglandin $F_{2\alpha}$ identifiziert, das auch ins Wasser abgegeben wird.^[6] Männliche Molche der Gattung *Cynops* benutzen 10 Aminosäuren große Peptide wie Sodefrin und Silefrin, um Weibchen im Wasser anzulocken.^[7] Es wurde kürzlich gezeigt, dass Frösche nicht nur auf derartige nichtflüchtige Verbindungen, sondern auch auf flüchtige Signale reagieren können, wobei die chemische Zusammensetzung dieser Pheromon-Systeme noch nicht bekannt ist.^[8]

Die Mantellidae sind eine sehr artenreiche Familie von meist kleinen Fröschen, die hauptsächlich im Regenwald von Madagaskar vorkommen.^[9] Bei einer Unterfamilie der Mantelliden, den Mantellinae, bilden die Männchen charakteristische Makrodrüsen an der Unterseite ihrer Hinterschenkel aus (Abbildung 1).^[10] Die Funktion dieser Femoraldrüsen ist bisher nicht bekannt, aber ihr geschlechtsspezifisches Auftreten und ihre Position lassen auf eine Funktion in der pheromonalen Kommunikation schließen. Hier präsentieren wir den überraschenden Fund von flüchtigen, nicht peptidartigen Verbindungen in den Femoraldrüsen, die als Phero-

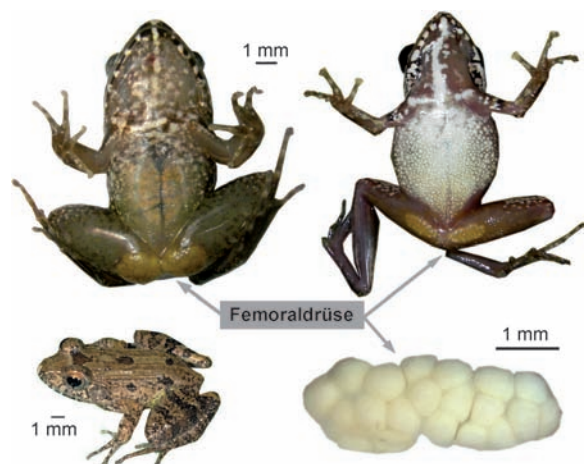


Abbildung 1. Bauch- und Seitenansicht eines Männchens von *Mantidactylus multiplicatus* (links) und Bauchansicht eines Männchens von *Gephyromantis decaryi* (rechts). Die Pfeile zeigen auf die Femoraldrüsen in den beiden Arten und auf die komplette Drüse von *G. decaryi* (unten rechts).

mone wirken und strukturverwandt mit flüchtigen Insektensekreten sind.

Die Femoraldrüsen von fünf Männchen von *Mantidactylus multiplicatus* wurden entfernt und mit Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden getrennt mit gaschromatographischen-massenspektrometrischen Methoden (GC-MS) analysiert, und es wurden zwei flüchtige Hauptkomponenten **A** und **B** entdeckt (Abbildung 2). Diese Verbindungen werden von anderen nichtflüchtigen Verbindungen wie diacetylierten Monoglyceriden und monoacetylierten Diglyceriden begleitet.

Verbindung **A** zeigte ein Massenspektrum, das dem von 2-Decanol sehr ähnlich ist. Da jedoch der gaschromatographische Retentionsindex abwich, wurde 8-Methyl-2-nonanol (**1**) als Struktur vorgeschlagen. Der Vorschlag wurde durch den Vergleich des Massenspektrums und des Retentionsindex mit synthetisiertem Material bestätigt (siehe die Hintergrundinformationen). Der Alkohol **1** ließ sich durch Kupplung des Tosylats von 5-Hexen-1-ol mit Isopropylmagnesiumbromid, Wacker-Oxidation und anschließender Reduktion mit LAH synthetisieren. Die Enantiomere des resultierenden racemischen 8-Methyl-2-nonanols wurden durch enzymatische Racematspaltung des entsprechenden Acetats getrennt. Eine gaschromatographische Analyse an chiraler Phase zeigte, dass der Naturstoff in der *R*-Konfiguration vorliegt (siehe die Hintergrundinformationen).

Das Massenspektrum von Verbindung **B** war identisch mit dem von Phoracantholid **J** (**2**). Bisher bekannte Syntheserouten zu enantiomerenreinem **2** sind entweder relativ lang

[*] D. Poth, Prof. Dr. S. Schulz
Institut für Organische Chemie
Technische Universität Braunschweig
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Deutschland)
E-Mail: stefan.schulz@tu-bs.de
Homepage: <http://aks7.org-chem.nat.tu-bs.de>
Dr. K. C. Wollenberg
Museum of Comparative Zoology
Department of Organismic and Evolutionary Biology
Harvard University, 26 Oxford St, Cambridge, MA 02138 (USA)
Prof. Dr. M. Vences
Zoologisches Institut, Technische Universität Braunschweig
Spielmannstraße 8, 38106 Braunschweig (Deutschland)

Hintergrundinformationen (experimentelle Daten) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106592> zu finden.

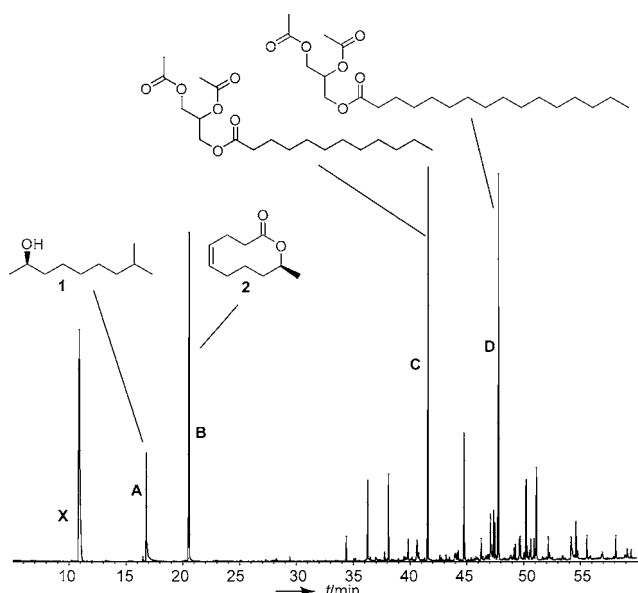
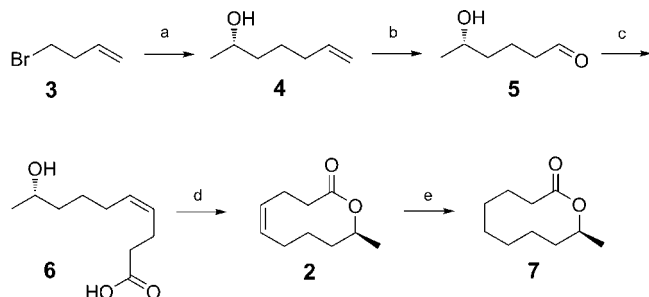


Abbildung 2. Gaschromatogramm eines Dichlormethanextrakts einer Femoraldrüse von *Mantidactylus multiplicatus*. Zwei flüchtige Hauptkomponenten **A** und **B** werden von einer komplexen Mischung von weniger flüchtigen Glyceriden begleitet. **C**: 3-(Dodecanoyloxy)propan-1,2-diylacetat, **D**: 3-(Palmitoyloxy)propan-1,2-diylacetat, **X**: Artefakt.

oder beruhen auf einer Ringschlussmetathese als Cyclisierungsmethode,^[11,12] die nach unserer Erfahrung schlechtere Ausbeuten und niedrigere Enantiomerenreinheit als berichtet lieferte. Daher wurde eine neue und kurze Synthese entworfen, die eine Corey-Nicolaou-Makrolactonisierung^[13] als Schlüsselschritt nutzt. Die Enantiomere des Lactons **2** wurden, wie in Schema 1 für das *S*-Enantiomer gezeigt, syn-



Schema 1. Synthese der Phoracantholide I (**7**) und J (**2**): a) 1. Mg, Et₂O, 2. CuCN, 3. (*S*)-Propylenoxid, 0 °C, 12 h, 91 %; b) K₂OsO₈, NaIO₄, Dioxan, H₂O, 0 °C, 2 h, 71 %; c) *n*BuLi, NaHMDS, [Ph₃P(CH₂)₃COOH]-Br, THF, -78 °C bis RT, 2 h, 69 %; d) 1. Dipyridyldisulfid, 2. AgClO₄, Toluol, Rückfluss, 14 h, 26 %; e) H₂, 10 % Pd/C, MeOH, 5 h 75 %.

thetisiert. Der Alkohol **4** wurde durch die Reaktion von Homoallylmagnesiumbromid mit (*S*)-Propylenoxid erhalten. Eine Lemieux-Johnson-Oxidation^[14] der Doppelbindung führte zum Aldehyd **5**, welcher in der folgenden Wittig-Reaktion mit (3-Carboxypropyl)triphenylphosphoniumylid vorzugsweise zur *Z*-konfigurierten Hydroxysäure reagierte (*Z*/*E* = 95:5). Abschließend wurde durch die Cyclisierung nach

der Corey-Nicolaou-Methode^[13] das Phoracantholid J (**2**) erhalten, welches dem Naturstoff **B** entspricht. Die Verbindung **2** ist bekannt als Komponente des Verteidigungssekrets des australischen Käfers *Phoracantha synonyma*,^[11,15] wo sie aber in der *R*-Konfiguration vorkommt. Dagegen konnte durch gaschromatographische Untersuchungen an chiraler Phase gezeigt werden, dass die Frösche das *S*-Enantiomer produzieren (siehe die Hintergrundinformationen). Die beiden identifizierten Verbindungen konnten in den Extrakten der Haut der Frösche, welche keine Makrodrüsen enthält, nicht nachgewiesen werden.

Anschließend wurde ein Biotest mit 109 lebenden Individuen von *M. multiplicatus* durchgeführt, um herauszufinden, ob die Verbindungen **1** und **2** das Verhalten der Tiere beeinflussen. Die einzelnen Frösche wurden in einen Plastikbehälter gesetzt, in dem auf jeder Seite ein Wattestück lag, welches mit der jeweils zu testenden Substanz bzw. mit der Kontrollsubstanz imprägniert war. Die Experimente wurden im Februar 2009 während der Fortpflanzungsperiode der Frösche mit zeitnah gefangenen Tieren und unter natürlichen Temperaturbedingungen durchgeführt. Das Experiment wurde mit jedem Frosch acht Mal wiederholt, mit einer Pause von mehreren Stunden nach jedem Experiment. Basierend auf 800 Fotoserien mit jeweils sieben Fotos, die im Abstand von 5 Minuten gemacht wurden (siehe die Hintergrundinformationen), wurde die Aktivität der Frösche als Funktion ihrer Positionswechsel gemessen. Mit Hexan imprägnierte Wattestücke ergaben eine geringere Aktivität als mit Wasser imprägnierte. Wenn sie Verbindung **1** oder **2** ausgesetzt wurden, zeigten die Männchen jedoch eine höhere Aktivität als bei der Exposition mit der Hexankontrolle (Abbildung 3). Außerdem machten die Männchen mit signifikanter Präfe-

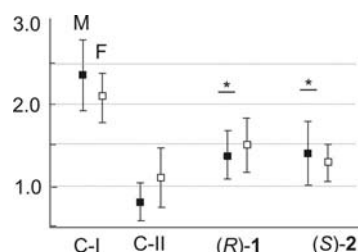


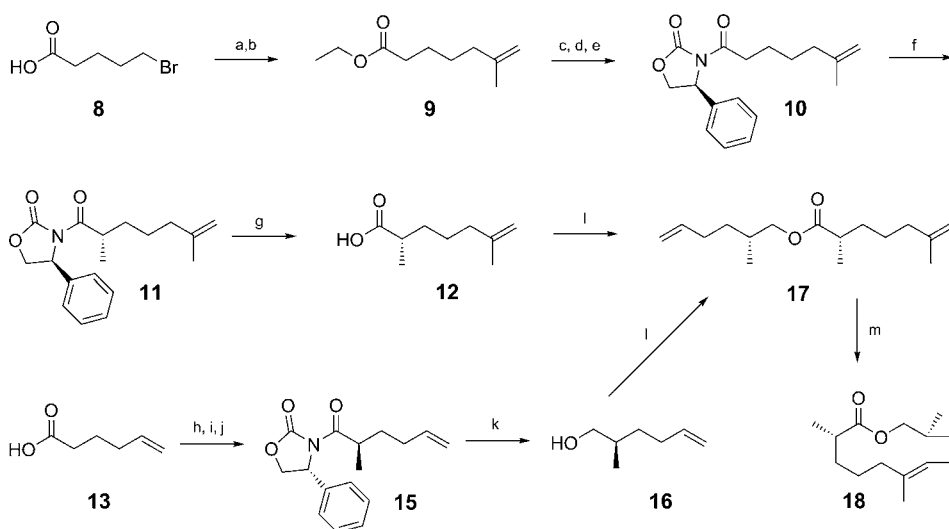
Abbildung 3. Aktivität (Anzahl der Positionswechseln in 7 Intervallen von 5 Minuten) für Männchen (M) und Weibchen (F) von *M. multiplicatus* nach Exposition gegen Wasser (C-I; Kontrolle, Männchen 100, Weibchen 216 Beobachtungsserien), Hexan (C-II; Kontrolle, Männchen 73, Weibchen 42) und die in Hexan gelösten Verbindungen **1** (Männchen 78, Weibchen 46) und **2** (Männchen 36, Weibchen 123). Die gesteigerte Aktivität im Vergleich zu der Hexankontrolle ist signifikant (die Sternchen markieren statistisch signifikante Unterschiede zu C-II; *P* < 0.05).

renz ihre erste Bewegung in Richtung der Seite des Behälters, in der Verbindung **1** angeboten wurde (siehe die Hintergrundinformationen). Trotz des offensichtlich störenden Effekts des Lösungsmittels zeigen diese ersten Ergebnisse, dass die Verbindungen **1** und **2** Verhaltensänderungen in konspezifischen Individuen hervorrufen. Somit entsprechen sie der allgemeinen Definition eines Pheromons und können auch

eine Rolle in der intraspezifischen Kommunikation spielen, wobei der genaue Wirkmechanismus zurzeit noch unbekannt ist.

Gemeinschaften von tropischen Amphibien können sehr artenreich sein. Im Ranomafana National Park in Madagaskar sind über 100 Arten von Fröschen mit teilweise sehr ähnlicher Morphologie vergesellschaftet, wovon der größte Teil zu den Mantellidae zählt.^[9] Deswegen wurde untersucht, ob die Femoraldrüsen der verschiedenen Mantelliden dieser Region ähnliche oder unterschiedliche Verbindungen enthalten. Die Analyse der Drüsen verschiedener Arten ergab, dass flüchtige Verbindungen bei den Mantelliden weit verbreitet sind, aber in artspezifischen Mischungen vorkommen. In Männchen des eng verwandten *Mantidactylus betsileanus* von drei verschiedenen Fundorten konnte Verbindung **2** nachgewiesen werden, jedoch fehlte der Alkohol **1**. Femoraldrüsen von *M. femoralis* enthielten ein eng verwandtes Makrolid, das (*S*)-Phoracantholid I (**7**), welches das hydrierte Analogon von **2** ist und auch in den *Phoracantha*-Käfern in umgekehrter Konfiguration vorkommt.^[11,15] Diese Verbindung wurde durch Hydrierung von Lacton **2** erhalten (Schema 1), und die absolute Konfiguration wurde mit GC an chiraler Phase bestimmt.

In einigen anderen *Mantidactylus*-Arten und anderen Mantelliden wie *Gephyromantis* wurden flüchtige Verbindungen in artspezifischen Mischungen gefunden, was eine Funktion in der intraspezifischen Kommunikation und Erkennung wahrscheinlich macht. Viele dieser Verbindungen sind Makrolide, deren Strukturen gegenwärtig aufgeklärt werden. Der Drüsenextrakt von *Gephyromantis boulengeri* enthielt hauptsächlich die Verbindung **E**. Der Extrakt wurde direkt mithilfe verschiedener NMR-Experimente analysiert (siehe die Hintergrundinformationen). Anhand der NMR-Daten und der Summenformel von $C_{14}H_{24}O_2$, die aus HR-GC-MS-Experimenten erhalten wurde, wurde die Struktur **18** vorgeschlagen. Die Verbindung (2*S*,6*E*,10*R*)-**18** wurde dann in enantiomerenangereicherter Form hergestellt, um die absolute Konfiguration der vorgeschlagenen Struktur **E** zu bestätigen (Schema 2). Ein Schlüsselschritt der Synthese war dabei die Ringschlussmetathese (RCM), um dem Makrolidring aufzubauen. 5-Brompentansäure (**8**) wurde in den entsprechenden Ethylester umgewandelt und dann unter Li_2CuCl_4 -Katalyse mit 2-Propenylmagnesiumbromid gekuppelt.^[16] Der resultierende Ester **9** wurde anschließend in das Evans-Amid **10** umgewandelt. Eine Alkylierung mit NaHMDS/Mel lieferte **11** in exzellenter Ausbeute und mit 99% Diastereoselektivität. Die Abspaltung des Auxiliars führte zur chiralen Säure **12**. Mithilfe der Evans-Methode wurde wiederum das alkylierte Evans-Amid **15** aus 5-Hexensäure (**13**) hergestellt. Die folgende Reduktion mit LAH



Schema 2. Synthese von Gephyromantolid A (**18**) aus *Gephyromantis boulengeri*: a) H_2SO_4 , EtOH, Rückfluss, 6 h, 84%; b) Li_2CuCl_4 , Isopropenylmagnesiumbromid, THF, 0°C, 12 h, 91%; c) KOH, EtOH, H_2O , Rückfluss, 4 h, 84%; d) $SOCl_2$, EtO₂, 0°C, 12 h, 84%; e) (*S*)-4-Phenylloxazolidin-2-on, $nBuLi$, THF, –78°C bis RT, 12 h, 91%; f) NaHMDS, Mel, THF, –78°C bis RT, 12 h, 95%; g) KOH, MeOH, H_2O , Rückfluss, 4 h, 82%; h) $SOCl_2$, EtO₂, 0°C, 12 h, 91%; i) (*R*)-4-Phenylloxazolidin-2-on, $nBuLi$, THF, –78°C bis RT, 12 h, 88%; j) NaHMDS, Mel, THF, –78°C bis RT, 12 h, 93%; k) $LiAlH_4$, EtO₂, RT, 86%; l) **16** + **12**, DMAP, EDC·HCl, CH_2Cl_2 , 0°C, 2 h, 92%; m) Stewart-Grubbs-Katalysator II, C_6F_6 , Toluol, 80°C, 3 h, 15%.

führte zum Alkohol **16**, welcher mit der Säure **12** zum ungesättigten Ester **17**, dem Ausgangsstoff für die Ringschlussmetathese, gekuppelt wurde. Die RCM stellte sich als anspruchsvoll heraus, sodass verschiedene Reaktionsbedingungen und Katalysatoren getestet wurden. Die besten Ergebnisse wurde mit dem Stewart-Grubbs-Katalysator und C_6F_6 in siedendem Toluol erzielt.^[17] Allerdings wurde als Produkt eine schwierig zu trennende Mischung des *E*- und *Z*-Isomers erhalten. Die anderen drei Enantiomere wurden nach der gleichen Syntheseroute aus den entsprechend methylierten Bausteinen **12** und **16** hergestellt. Die reine Verbindung **18** konnte durch semipräparative HPLC-Trennung isoliert werden. Die folgenden GC-Analysen an chiraler Phase zeigten, dass es sich bei dem (2*S*,6*E*,10*R*)-Enantiomer **18** in der Tat um den Naturstoff **E** handelt. Diese Verbindung ist somit ein neuer Naturstoff, für den wir den Namen Gephyromantolid A vorschlagen. Während die Verbindungen **1**, **2** und **7** Metabolite des Fettsäurestoffwechsels sind, kann man bei Verbindung **18** typische terpenoide Verzweigungen erkennen. Jedoch fehlt im Vergleich zu Sesquiterpenen ein Kohlenstoffatom, und deshalb könnte **18** ebenfalls aus dem Fettsäurestoffwechsel stammen. Die Methylverzweigungen werden während der Biosynthese wahrscheinlich durch Methylmalonatbausteine, welche die üblichen Malonatbausteine ersetzen, eingeführt.

Zusammengefasst konnten wir erstens das Vorkommen von flüchtigen Verbindungen in den für männliche Frösche spezifischen Drüsen und zweitens die verhaltensverändernde Wirkung dieser Verbindungen auf die Frösche experimentell zeigen. Dies weist darauf hin, dass Amphibien auch flüchtige Pheromone zur Kommunikation verwenden, was für diese Wirbeltiergruppe bisher noch nicht nachgewiesen war. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mantelliden artspezifisch

sche Mischungen von Verbindungen produzieren, die oft eine Makrolid-Struktur aufweisen. In den meisten Froscharten ist die akustische Kommunikation der vorherrschende Mechanismus, um Weibchen über längere Distanzen anzulocken. Jedoch können flüchtige Verbindungen besonders in hochdiversen tropischen Amphibiengemeinschaften eine bis dato unterschätzte Rolle in der Artenerkennung auf kurze Distanz spielen. Dies könnte einen bedeutenden Einfluss auf die Artbildung und die Evolution dieser Amphibien haben.

Eingegangen am 16. September 2011,
veränderte Fassung am 18. November 2011
Online veröffentlicht am 20. Januar 2012

Stichwörter: Amphibien · Chemische Kommunikation · Gaschromatographie an chiraler Phase · Makrolide · Pheromone

- [1] L. D. Houck, *Annu. Rev. Physiol.* **2009**, *71*, 161–176; S. K. Woodley, *J. Comp. Physiol. A* **2010**, *196*, 713–727.
- [2] R. M. Belanger, L. D. Corkum, *J. Herpetol.* **2009**, *43*, 184–191.
- [3] A. W. Perriman, M. A. Apponyi, M. A. Buntine, J. R. Jackway, M. W. Rutland, J. W. White, J. H. Bowie, *FEBS J.* **2008**, *275*, 3362–3374.
- [4] P. A. Wabnitz, J. H. Bowie, M. J. Tyler, J. C. Wallace, B. P. Smith, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 269–275; S. Kikuyama, K. Yamamoto, T. Iwata, F. Toyoda, *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **2002**, *132*, 69–74.
- [5] R. A. Watts, C. A. Palmer, R. C. Feldhoff, P. W. Feldhoff, L. D. Houck, A. G. Jones, M. E. Pfrender, S. M. Rollmann, S. J. Arnold, *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21*, 1032–1041; C. A. Palmer, R. A. Watts, R. G. Gregg, M. A. McCall, L. D. Houck, R. Highton, S. J. Arnold, *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 2243–2256.
- [6] J. Eom, Y. R. Jung, D. Park, *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **2009**, *154*, 61–69.
- [7] S. Kikuyama, F. Toyoda, T. Ohmiya, K. Matsuda, S. Tanaka, H. Hayashi, *Science* **1995**, *267*, 1643–1645; K. Yamamoto, Y. Kawai, T. Hayashi, Y. Ohe, H. Hayashi, F. Toyoda, G. Kawahara, T. Iwata, S. Kikuyama, *FEBS Lett.* **2000**, *472*, 267–270.
- [8] P. G. Byrne, J. S. Keogh, *Anim. Behav.* **2007**, *74*, 1155–1162.
- [9] D. R. Vieites, K. C. Wollenberg, F. Andreone, J. Köhler, F. Glaw, M. Vences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8267–8272.
- [10] M. Vences, G. Wahl-Boos, S. Hoegg, F. Glaw, E. Spinelli Oliveira, A. Meyer, S. Perry, *Biol. J. Linn. Soc.* **2007**, *92*, 529–539.
- [11] T. Kitahara, K. Koseki, K. Mori, *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 389–393.
- [12] G. H. Posner, M. A. Hatcher, W. A. Maio, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4301–4303; R. Chênevert, N. Pelchat, P. Morin, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1191–1196.
- [13] E. J. Corey, K. C. Nicolaou, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5614–5616; H. Gerlach, A. Thalmann, *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 2661–2663.
- [14] R. Pappo, D. S. Allen, R. U. Lemieux, W. S. Johnson, *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 478–479.
- [15] B. P. Moore, W. V. Brown, *Aust. J. Chem.* **1976**, *29*, 1365–1374.
- [16] J. Klimentová, P. Kosák, K. Vávrová, T. Holas, A. Hrabálek, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7681–7687.
- [17] I. C. Stewart, T. Ung, A. A. Pletnev, J. M. Berlin, R. H. Grubbs, Y. Schrodi, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1589–1592; D. Rost, M. Porta, S. Gessler, S. Blechert, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5968–5971.