

# Röntgenstrukturanalyse von Mezerein aus *Daphne mezereum* L.

X-Ray Structure Analysis of Mezerein from *Daphne mezereum* L.

H. Lotter

Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

und

A. Jones und M. Sturm

Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München

(Z. Naturforsch. 32 c, 678–682 [1977]; eingegangen am 1. August 1977)

Mezerein, *Daphne mezereum*, X-Ray Structure, Antileukemic Principle

The X-ray structure of Mezerein from *Daphne mezereum* L. was determined by aid of direct methods. Comparison with Phorbol and Daphnetoxin led to the absolute configuration. A tentative mechanism for the antileukemic activity is proposed.

Im Rahmen unserer Strukturuntersuchungen an cocarcinogenen und antitumorwirksamen Verbindungen pflanzlicher Herkunft haben wir bereits früher über die Struktur des Phorbols aus Euphorbiaceen-Arten berichtet<sup>1</sup>. Ein ähnliches Kohlenstoffgrundgerüst wie das Phorbol besitzen zwei Verbindungen, die aus dem Seidelbast (*Daphne mezereum* L.) isoliert wurden. Die beiden alkoholischen Diterpenester Daphnetoxin und Mezerein besitzen wie die Phorbolester eine cocarcinogene und hautreizende Wirkung<sup>2</sup>. Darüber hinaus zeigt das Mezerein im Mäusetest in einer Dosierung von 50 µ/kg eine deutliche Hemmwirkung gegenüber P-388 und L-1210 Leukämien<sup>3</sup>.

Die Struktur des Daphnetoxins ist von Stout<sup>4</sup> durch Röntgenstrukturanalyse geklärt worden. Die ersten Untersuchungen über das Mezerein stammen von Schildknecht u. a.<sup>5, 6</sup> sowie Ronlan und Wick-

berg<sup>7</sup>. Demnach mußte das Mezerein dasselbe Kohlenstoffgrundgerüst wie Phorbol und Daphnetoxin besitzen. Vom Daphnetoxin sollte es sich durch eine zusätzliche Phenylbutadiensäure (Cinnamal-essigsäure)-estergruppe unterscheiden. Die von beiden Autoren gemachten Strukturvorschläge unterscheiden sich nur in der Stellung dieser Esterfunktion (C<sub>5</sub> oder C<sub>12</sub> – OH).

Um zwischen beiden Strukturen entscheiden zu können und um aus der räumlichen Struktur des komplexen Moleküls Hinweise über den möglichen Mechanismus der beschriebenen biologischen Aktivitäten zu erhalten, haben wir mit einem von Herrn Prof. Schildknecht (Heidelberg) erhaltenen Einkristall eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Nach Abschluß unserer Arbeiten, die zur endgültigen Struktur des Mezereins führten, erhielten wir Kenntnis von einer Kurzmitteilung von Nyborg und

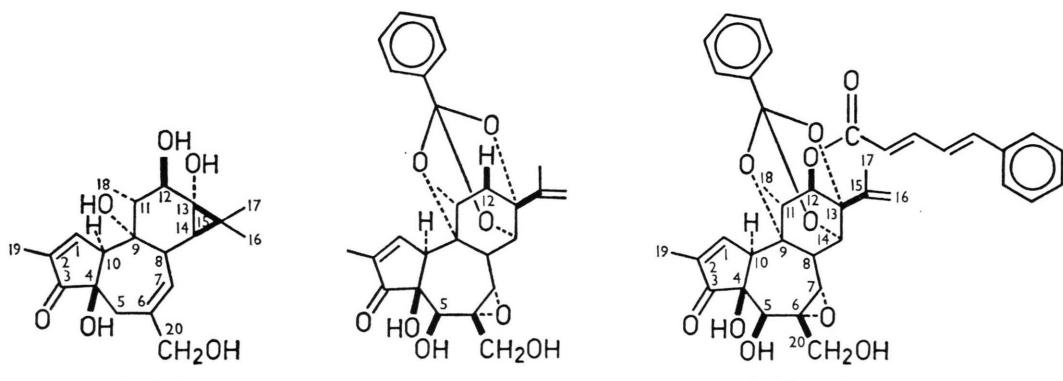


Abb. 1. a) Phorbol

b) Daphnetoxin

c) Mezerein

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Wagner, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, Karlstraße 29, D-8000 München 2.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

La Cour<sup>8</sup>, in der ebenfalls über die Strukturaufklärung des Mezereins berichtet wurde. Da eine ausführliche Mitteilung bisher nicht erfolgt ist, geben wir nachstehend unsere unabhängig davon erhaltenen Ergebnisse bekannt.

### Ergebnis und Diskussion

Die Röntgenstrukturanalyse zeigte, daß Mezerein die Struktur des Daphnetoxins mit der Cinnamallessigsäure in Position 12 besitzt, wenn man der Numerierung des Phorbols folgt. Somit konnte zugunsten des Strukturvorschlags von Ronlan und Wickberg<sup>7</sup> entschieden werden. Abb. 2 gibt die Struktur des Moleküls, Abb. 3 die Abstände und Winkel der C – C- und C – O-Bindungen wieder. Der Vergleich mit den bekannten absoluten Konfigurationen des Phorbols und Daphnetoxins ergibt für das Mezerein zugleich seine absolute Konfiguration (Abb. 2).

Mezerein ist ein tricyclisches Diterpen. Die drei Ringsysteme sind untereinander *trans* verknüpft.

Im Cyclopentenring sind die Bindungswinkel der  $sp^2$ -hybridisierten Kohlenstoffe merklich kleiner als  $120^\circ$  ( $112^\circ$  und  $109,8^\circ$ ). Im 7-Ring sind die Winkel am C<sub>6</sub> und C<sub>7</sub> offensichtlich durch die Epoxidbrücke stark aufgeweitet. Auch die übrigen Bindungswinkel (Mittelwert  $114,7^\circ$ ) liegen erheblich über dem Tetraederwinkel von  $109,5^\circ$ . Der Cyclohexanring liegt in verdrillter Wannenform vor. Die Strukturanalyse zeigte sehr deutlich die Lage der im Molekül enthaltenen Doppelbindungen anhand der Bindungslängen an, insbesondere in der Seitenkette der Cinnamalessigsäure. Auffallend ist die weit aus dem Ringsystem herausragende Seitenkette. Die gegenüberliegende Seite des Moleküls erhält dagegen durch die tertiären und sekundären OH-Gruppen am 7-Ring einen mehr hydrophilen Charakter. Ähnliche Struktureigentümlichkeiten besitzen die antileukämisch wirksamen Maytansid-Ester<sup>9</sup>. Diese besitzen ein 19-gliedriges Ringsystem, in dem die beiden längeren Seiten nahezu parallel zueinander verlaufen. Von diesen trägt die eine Seite ebenfalls eine herausragende Esterfunktion.

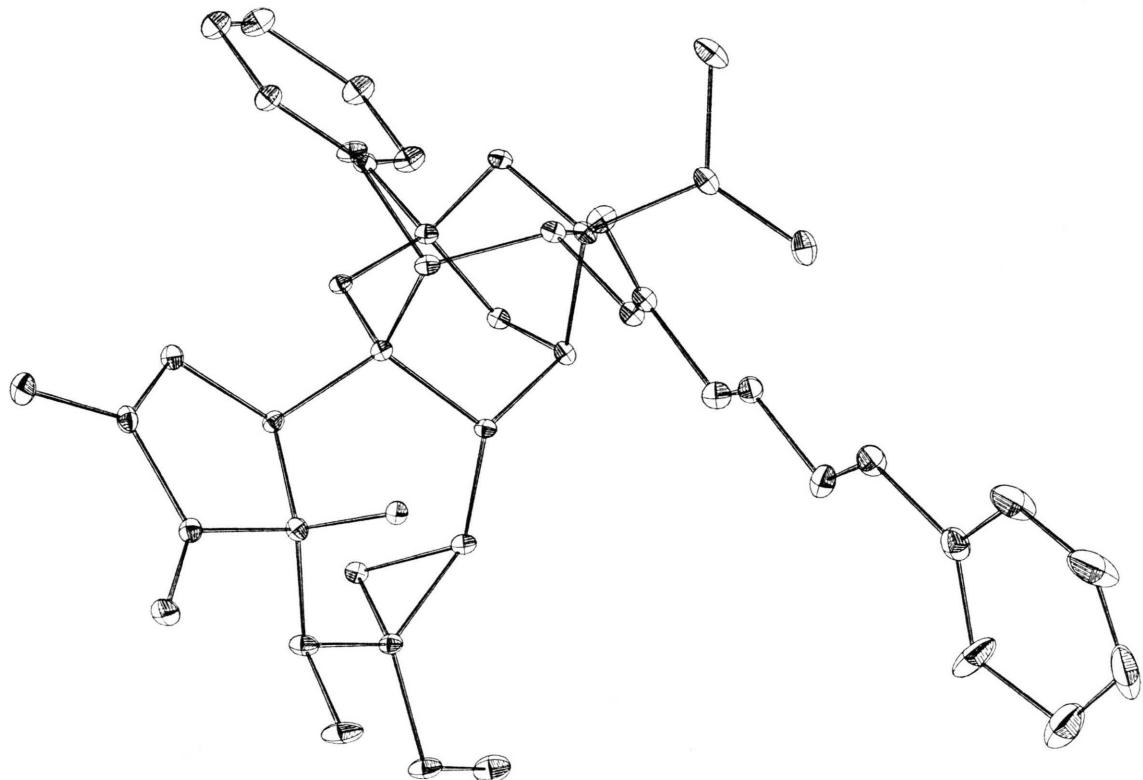


Abb. 2. Molekülstruktur in der Projektion auf die kristallographische X-Y-Ebene. 50% Wahrscheinlichkeit für die Lage der Atome innerhalb der Schwingungsellipsoide.

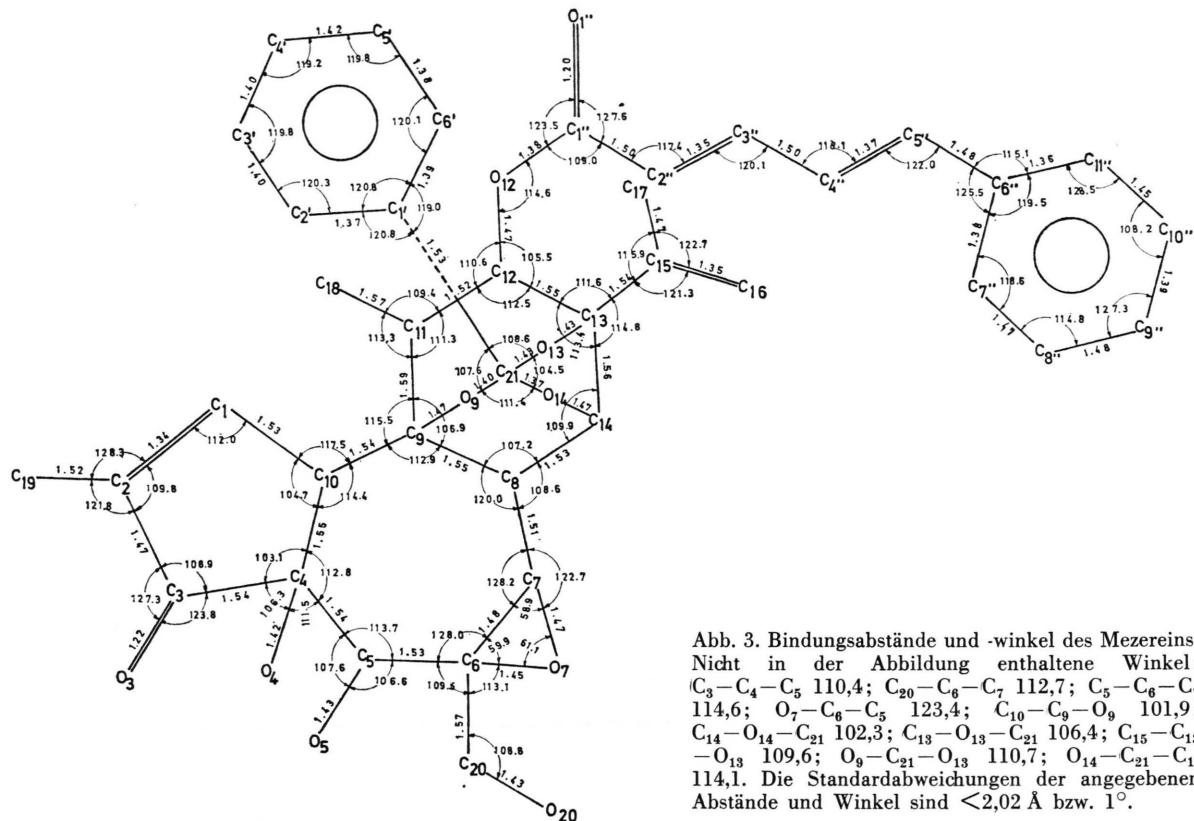


Abb. 3. Bindungsabstände und -winkel des Mezereins. Nicht in der Abbildung enthaltene Winkel:  $C_3-C_4-C_5$  110,4;  $C_{20}-C_6-C_7$  112,7;  $C_5-C_6-C_7$  114,6;  $O_7-C_6-C_5$  123,4;  $C_{10}-C_9-O_9$  101,9;  $C_{14}-O_{14}-C_{21}$  102,3;  $C_{13}-O_{13}-C_{21}$  106,4;  $C_{15}-C_{13}-O_{13}$  109,6;  $O_9-C_{21}-O_{13}$  110,7;  $O_{14}-C_{21}-C_1$  114,1. Die Standardabweichungen der angegebenen Abstände und Winkel sind  $< 2,02 \text{ \AA}$  bzw.  $1^\circ$ .

Da die nicht veresterten Maytansinoide nicht mehr antileukämisch wirken und auch für den Grundalkohol Phorbol bisher nur eine cocarcinogene, aber keine cancerostatische Wirkung beschrieben wurde, wäre denkbar, daß auch für die Wirkung des Mezereins diese Esterfunktion bei der Bildung selektiver Molekülkomplexe mit biologischen, das Wachstum regulierenden Makromolekülen eine wichtige Rolle spielt.

### Experimenteller Teil

Mezerein kristallisierte in gelblichen durchsichtigen Prismen. Von einem Kristall der Größe  $0,5 \times 0,4 \times 0,2 \text{ mm}$  wurden Oszillations-, Weissenberg- und Präzessions-Aufnahmen gemacht. Sie wiesen auf die orthorhombische Raumgruppe  $P2_12_12_1$  und die folgenden Gitterkonstanten hin:  $a = 21,92 \text{ \AA}$ ,  $b = 11,52 \text{ \AA}$ ,  $c = 13,42 \text{ \AA}$ . Die Dichte wurde mit der Schwebemethode in  $\text{H}_2\text{O}/\text{KBr}$ -Lösung zu  $1,228 \text{ g/cm}^3$  bestimmt und ergibt 4 Moleküle in der Elementarzelle.

Auf einem Siemens-Einkristalldiffraktometer wurden mit  $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung 2808 unabhängige Reflexe bis zu einem maximalen  $\Theta$  von  $60^\circ$  gemessen, wovon 227 [ $< 2\sigma(J)$ ] nicht beobachtet waren ( $\Theta/2\Theta$ -Abtastung, scan-Breite  $\pm 1^\circ$ , 5-Wert-Messung, Meßgeschwindigkeit 60 sec pro Grad). Nach jeweils 20 Reflexen wurde ein Referenzreflex gemessen, dessen Intensität während der Messung um

Tab. I. Reflex-Startsatz.

$h$	$k$	$l$	$E$	Verwendung	Startphasen	Phasen nach Endverfeinerung
9	0	11	3,59	Ursprungs-festlegung	90°	90°
1	1	0	2,51		90°	90°
11	0	10	2,49		360°	360°
10	1	9	2,93	enantiom.	45°, 135°	143°
12	1	8	2,76	permutiert	45°, 135°	94°
7	5	9	2,40		225°, 315°	312°

Tab. II. Atomparameter des Mezereins. Die Orts- und Temperaturparameter sind mit einem Faktor  $10^4$  multipliziert. Die in Klammern angegebenen mittleren Fehler beziehen sich auf die letzte angegebene Dezimalstelle. Die Ortsparameter  $x$ ,  $y$ ,  $z$  sind in fraktionellen Einheiten der Elementarzellenkonstanten angegeben.

	$x$	$y$	$z$	$\beta_{11}$	$\beta_{22}$	$\beta_{33}$	$\beta_{12}$	$\beta_{13}$	$\beta_{23}$
C(1)	8323(4)	7807(7)	1880(6)	23(2)	70(7)	51(5)	5(3)	1(3)	3(6)
C(2)	7962(4)	8105(7)	2645(7)	25(2)	65(7)	60(6)	7(4)	3(3)	12(6)
C(3)	7470(4)	7247(8)	2757(7)	24(2)	76(7)	49(5)	3(4)	-1(3)	-2(6)
C(4)	7596(4)	6222(7)	2055(6)	19(2)	68(7)	41(5)	4(3)	4(3)	-8(5)
C(5)	7012(4)	5906(9)	1472(6)	18(2)	119(10)	46(5)	-1(4)	7(3)	-23(6)
C(6)	7124(4)	5064(8)	605(6)	18(2)	77(8)	46(5)	-4(3)	-3(3)	-13(6)
C(7)	7712(3)	4556(8)	273(6)	17(2)	90(8)	28(4)	-7(3)	2(2)	-2(6)
C(8)	8324(3)	4608(7)	794(6)	13(2)	69(7)	36(4)	-1(3)	-0(2)	-10(5)
C(9)	8599(4)	5784(7)	1103(5)	18(2)	64(7)	34(5)	-4(3)	2(2)	-1(5)
C(10)	8110(4)	6688(7)	1376(6)	18(2)	59(7)	44(5)	-3(3)	2(3)	-8(5)
C(11)	9089(3)	5528(8)	1944(6)	17(2)	82(8)	35(4)	-2(3)	-5(2)	-7(5)
C(12)	9409(4)	4379(8)	1764(6)	18(2)	92(8)	29(4)	0(3)	1(2)	12(5)
C(13)	9435(4)	4052(8)	644(6)	17(2)	88(8)	40(5)	6(3)	-2(3)	-3(6)
C(14)	8796(4)	3994(7)	140(5)	17(2)	76(7)	24(4)	9(3)	-0(2)	10(5)
C(15)	9843(4)	2985(9)	464(6)	24(2)	107(9)	40(5)	21(4)	-0(3)	2(6)
C(16)	9609(5)	1898(9)	461(8)	45(4)	89(10)	63(7)	20(5)	2(4)	4(7)
C(17)	10498(5)	3223(12)	325(9)	22(3)	181(16)	105(10)	25(6)	6(4)	16(12)
C(18)	9578(4)	6516(9)	2055(7)	19(2)	117(10)	59(6)	-15(4)	-5(3)	-15(7)
C(19)	7998(5)	9181(9)	3300(8)	41(3)	87(9)	85(8)	4(5)	-2(4)	-56(8)
C(20)	6510(4)	4467(10)	304(7)	24(2)	142(12)	57(6)	-24(4)	1(3)	-25(8)
C(21)	9242(3)	5610(7)	-373(6)	17(2)	77(7)	40(5)	1(3)	1(2)	-2(5)
C(1)'	9542(4)	6369(8)	-1166(6)	15(2)	82(8)	44(5)	2(3)	3(2)	4(5)
C(2)'	9756(4)	7448(8)	-922(7)	29(2)	91(9)	56(6)	-9(4)	2(3)	4(6)
C(3)'	10065(5)	8116(10)	-1629(7)	33(3)	109(10)	62(6)	-10(5)	9(4)	17(7)
C(4)'	10127(5)	7706(10)	-2602(8)	35(3)	133(12)	53(7)	-20(5)	7(4)	18(8)
C(5)'	9902(5)	6585(10)	-2842(7)	33(3)	124(11)	54(6)	-16(5)	11(4)	5(8)
C(6)'	9609(5)	5935(9)	-2123(7)	29(3)	124(11)	47(6)	-14(5)	10(3)	-2(7)
C(1)''	9167(4)	3342(8)	3266(6)	23(2)	92(8)	42(5)	11(4)	4(3)	4(6)
C(2)''	8759(4)	2418(9)	3676(6)	28(3)	114(10)	49(5)	-1(4)	9(3)	-5(7)
C(3)''	8832(4)	2123(8)	4644(7)	27(2)	88(8)	64(7)	5(4)	11(3)	15(7)
C(4)''	8446(5)	1221(9)	5090(8)	42(3)	84(9)	71(7)	-1(5)	23(4)	-7(7)
C(5)''	8605(5)	803(10)	6007(9)	33(3)	121(12)	109(9)	8(5)	20(5)	52(9)
C(6)''	8285(6)	-192(11)	6469(10)	38(4)	128(13)	119(10)	21(6)	34(5)	32(11)
C(7)''	2742(8)	5659(13)	3854(13)	77(7)	189(18)	164(15)	74(10)	-70(9)	-71(14)
C(8)''	2507(11)	6698(18)	3352(18)	96(10)	177(22)	283(27)	68(13)	-108(14)	-99(21)
C(9)''	2875(13)	7099(18)	2498(23)	121(12)	209(22)	260(34)	-113(14)	-64(19)	105(24)
C(10)''	3331(9)	6515(25)	2031(29)	30(5)	575(47)	866(63)	-57(13)	-70(15)	599(48)
C(11)''	3556(7)	5629(17)	2705(17)	32(4)	328(30)	308(27)	-32(10)	-33(9)	239(26)
O(3)	7021(3)	7308(6)	3313(5)	27(2)	122(7)	58(4)	9(3)	14(2)	-13(5)
O(4)	7793(3)	5290(5)	2666(4)	21(1)	70(5)	39(3)	-1(2)	6(2)	1(4)
O(5)	6608(3)	5331(8)	2144(5)	22(2)	219(11)	77(5)	-30(4)	22(3)	-53(7)
O(7)	7446(2)	5562(5)	-237(4)	16(1)	81(5)	36(3)	0(2)	0(2)	2(4)
O(9)	8893(2)	6339(4)	243(4)	15(1)	72(5)	34(3)	-5(2)	6(2)	-3(3)
O(12)	9076(2)	3424(5)	2251(4)	21(1)	92(5)	33(3)	4(2)	-3(2)	5(4)
O(13)	9711(2)	5054(5)	197(4)	15(1)	86(5)	44(3)	1(2)	0(2)	6(4)
O(14)	8898(2)	4713(5)	-745(3)	16(1)	69(5)	34(3)	2(2)	1(2)	-1(3)
O(20)	6602(3)	3808(8)	-583(5)	35(2)	177(10)	80(5)	-21(4)	-7(3)	-16(6)
O(1)''	9527(3)	3928(6)	3714(4)	30(2)	116(7)	59(4)	-14(3)	-8(2)	5(4)

weniger als 5% abfiel, so daß alle Daten an einem einzigen Kristall gesammelt werden konnten. Absolute Skalierung wurden mit Wilson-Statistik vorgenommen und ergab einen Skalierungsfaktor von 0,29 und einen overall Temperaturfaktor  $B = 5,1 \text{ \AA}^2$ . Eine Absorptionskorrektur wurde nicht vorgenommen, da die Verbindung kein Schweratom enthielt und der zur Messung verwendete Kristall keine extreme Plättchenform aufwies. Atomformfaktoren wurden den „International Tables for X-Ray Crystallography“ entnommen<sup>10</sup>.

Die Struktur wurde gelöst mit Hilfe von direkten Methoden<sup>11</sup> unter Verwendung des Programm-systems MULTAN 74<sup>12</sup>. Für diese große Molekül-struktur schien es uns zweckmäßig, das vorhandene Programm so zu erweitern, daß es eine möglichst hohe Anzahl von Phasenbeziehungen ( $\Sigma_2$  relations) speichert. Wir ließen deshalb 4999 Phasenbeziehun-gen bei 400 E-Werten zu. Neben drei vorgegebenen Startreflexen für die Wahl des Ursprungs und einem Reflex für die Festlegung der enantiomorphen Struktur wurden zwei weitere allgemeine Re-flexe ausgewählt und deren Phasen permutiert (siehe Tab. I.).

Alle Rechnungen wurden mit der Rechenanlage Siemens 4004/150 des Martinsrieder Max-Planck-Institutes für Biochemie durchgeführt.

Damit wurden für die 400 größten E's 32 möglichen Phasensätze berechnet. Für die beste Lösung auf Grund des Kriteriums der „combined figure of merit“ (abs fom 1,20,  $\psi_0$  0,32  $\times 10^3$ , resid 31,8, cofm 3,0) wurde eine E map gerechnet. Diese zeigte bereits die gesamte Struktur mit Ausnahme der Seitenkette am C<sub>12</sub>, also 35 Atome (ohne H). Die Lage der restlichen Atome wurde aus einer sukzes-siven Fourier-Synthese mit komplettem Datensatz, phasiert mit den bereits bekannten Atomen, be-stimmt. Von diesem Stadium ab wurden die Rech-nungen mit den Programmen des X-Ray Systems durchgeführt<sup>13</sup>. Vier anschließende isotrope Verfei-nerungszyklen begannen bei einem R-Faktor von 34,3% und konvergierten bei R = 13,2%. In drei weiteren anisotropen Verfeinerungszyklen sank der R-Wert auf 8,6%. Die Struktur mit den thermi-schen Schwingungsellipsoiden am Ende der Verfei-nerung zeigt Abb. 2. Für den Temperaturfaktor wurde der Ausdruck  $\exp[-(h^2\beta_{11} + k^2\beta_{22} + l^2\beta_{33} + 2hk\beta_{12} + 2hl\beta_{13} + 2kl\beta_{23})]$  verwendet.

<sup>1</sup> W. Hoppe, K. Zechmeister, M. Röhrl, F. Brandl, E. Hecker, G. Kreibich u. H. Bartsch, Tetrahedron Lett. **8**, 667 [1969].

<sup>2</sup> E. Hecker, Z. Krebsforsch. **68**, 325 [1966].

<sup>3</sup> R. J. Geran, N. H. Greenberg, M. M. McDonald, A. M. Schuhmacher u. B. J. Abbott, Cancer Chemother. Rep. Part 3, **3**, 1 [1972].

<sup>4</sup> G. H. Stout, W. G. Balkenhohl, M. Pohling u. G. L. Hickernell, J. Amer. Chem. Soc. **92**, 1070 [1970].

<sup>5</sup> H. Schildknecht, G. Edelmann u. R. Maurer, Chem.-Ztg. **94**, 347 [1970].

<sup>6</sup> H. Schildknecht u. R. Maurer, Chem.-Ztg. **94**, 894 [1970].

<sup>7</sup> A. Ronlan u. B. Wickberg, Tetrahedron Lett. **49**, 4261 [1970].

<sup>8</sup> J. Nyborg u. T. La Cour, Nature **257**, 824 [1975].

<sup>9</sup> S. M. Kupchan, Y. Komoda, A. R. Branfman, R. G. Dailey Jr. u. V. A. Zimmerly, J. Amer. Chem. Soc. **96**, 3706 [1974].

<sup>10</sup> International Tables for X-Ray Cristallography, Vol. III, Kynoch Press, Birmingham, England 1962.

<sup>11</sup> W. Hoppe, J. Gaßmann u. K. Zechmeister, Crystallo-graphic Computing, S. 26, Ahmed, Copenhagen-Munks-gaard.

<sup>12</sup> MULTAN 74, A System of Computer Programs by P. Main, M. Woolfson, L. Lessinger (University of York, England), and G. Germain, J.-P. Declercq (Institut Lavo-i-sier, Belgique).

<sup>13</sup> J. M. Steward, G. J. Kruger, H. L. Ammon, C. Dickinson u. S. R. Hall, The X-Ray System, Version of June 1972, Technical Report TR-192, Computer Science Center, University of Maryland 1972.

<sup>14</sup> Strukturfaktorentabellen sind von den Autoren erhältlich.