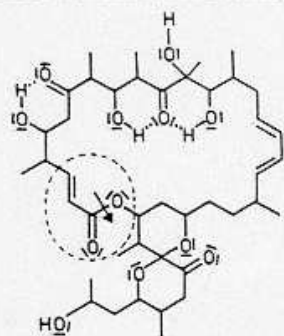
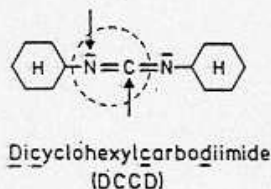


Book-Appendix (R.Kiehl, D-93437 Furth, www.rki-i.com, kiehl@rki-i.com)

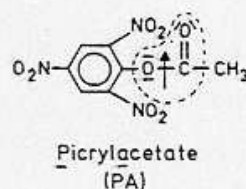
A) $F_0 F_1$ - Inhibitors :



Oligomycin D (Rutamycin)

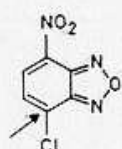


Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)

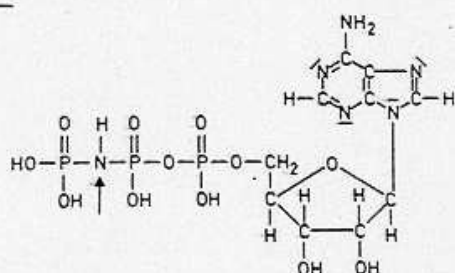


Picrylacetate (PA)

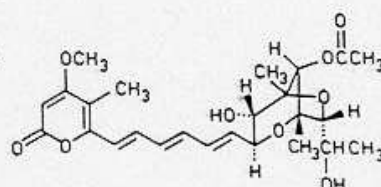
B) F_1 - Inhibitors :



7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl)

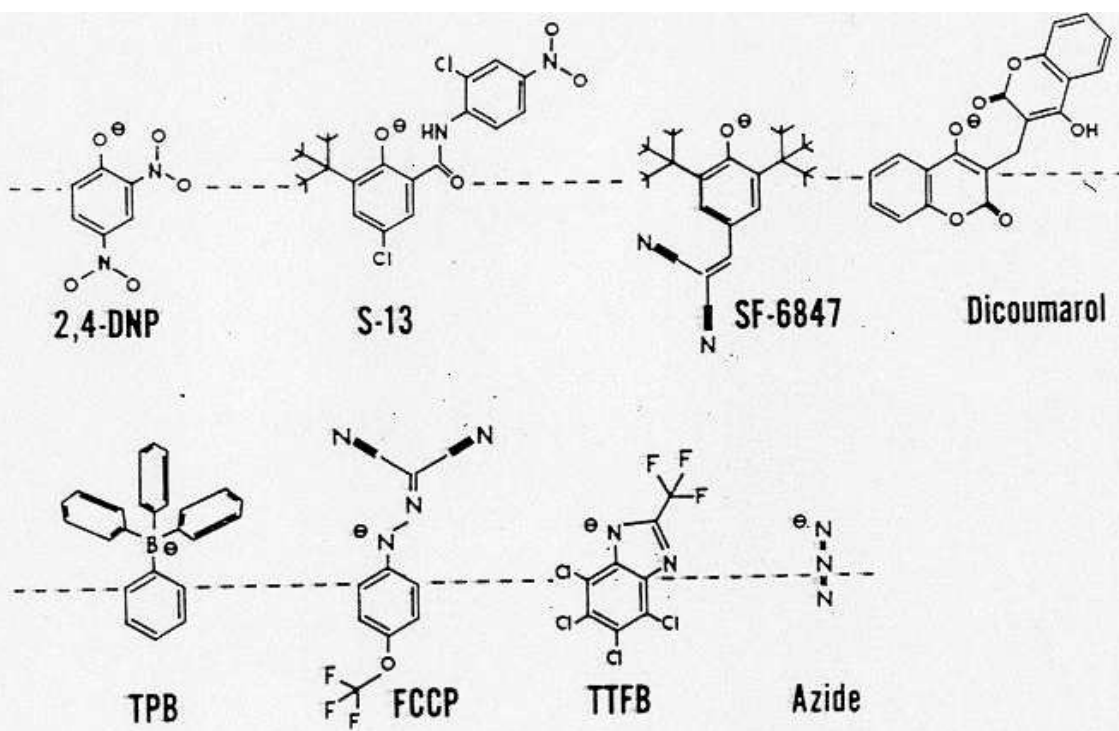


Adenylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP)

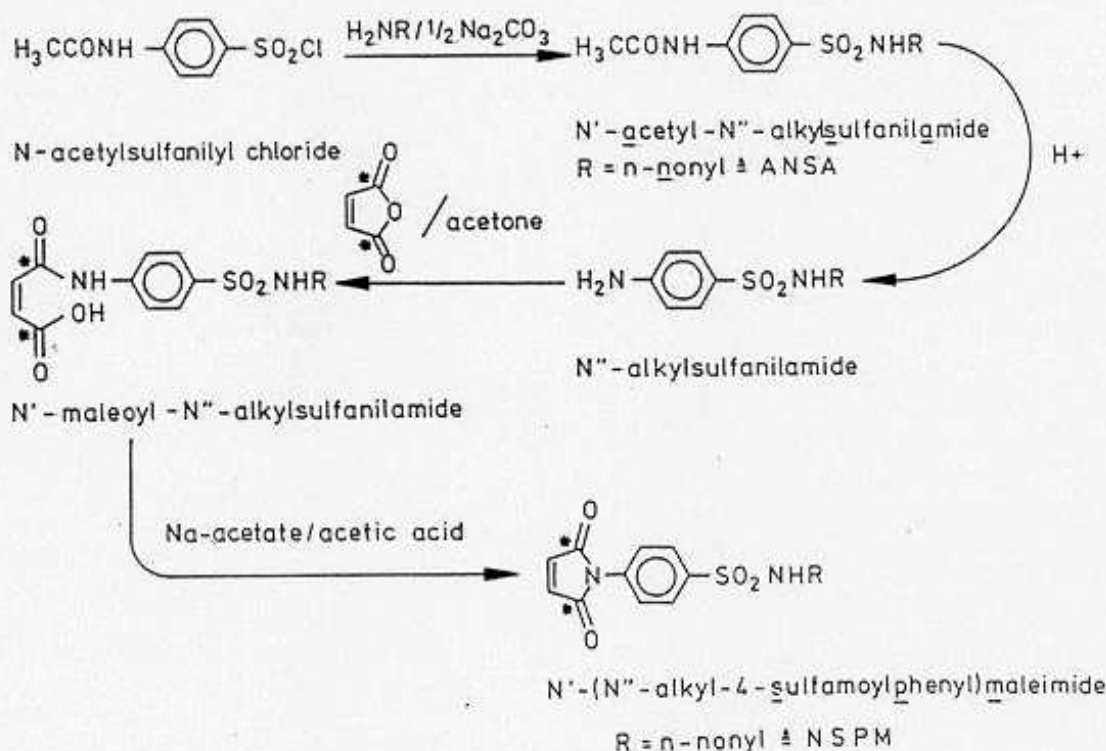


Aureovertin D

Uncouplers:



Synthesis of N¹(N⁴-n-alkyl-4-sulfamoylphenyl)-maleimides



1978

E. Bäuerlein und R. Kiehl

675

Liebigs Ann. Chem. 1978, 675-679

Synthese von 1-(n-Alkyl)thioharnstoffen, 6-(n-Alkyl)thiouracilen und radioaktiven 6-Nonyl-2-thiouracilen, I

Edmund Bäuerlein *) und Reinhold Kiehl¹⁾

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Naturstoff-Chemie, Jahnstraße 29, D-6900 Heidelberg

Eingegangen am 2. August 1977

Die Synthese von längerketigen 1-(n-Alkyl)thioharnstoffen 5 und 6-(n-Alkyl)thiouracilen 8, die als nucleophile Abfangreagentien für Sulfenylkationen (RS⁺) in lipophilen Membranen einsetzbar sind²⁾, wird beschrieben. Eine Mikrosynthese für [¹⁴C]- und [³⁵S]-6-Nonyl-2-thiouracil ist analog entwickelt worden.

Synthesis of 1-(n-Alkyl)thiureas, 6-(n-Alkyl)thiouracils and Radioactive 6-Nonyl-2-thiouracils, I

The synthesis of the long-chain 1-(n-alkyl)thiureas 5 and 6-(n-alkyl)thiouracils 8, useful as nucleophilic trapping agents for sulfenyl cations (RS⁺) in lipophilic membranes²⁾, is described. A method for the synthesis of [¹⁴C]- and [³⁵S]-6-(nonyl)-2-thiouracil on a microscale has also been developed.

Thioharnstoff, Thiouracil und auch 6-Propylthiouracil wurden als Abfangreagentien für die Sulfenylkationen (RS⁺) des Lactoglobulins angegeben, welche durch Umsetzung einer isolierten Thiolgruppe mit KI₃ in lipophiler Umgebung des Proteins entsteht³⁾. In Modellreaktionen zur oxidativen Phosphorylierung wurde anorganisches Phosphat durch Oxidation von Thiolen aktiviert und mit Adenosinphosphat zum Adenosintriphosphat umgesetzt⁴⁾. Das gemischte Anhydrid aus Sulfensäure und Phosphorsäure, RSOPO₃H₂, wurde als „aktives Phosphat“ in biochemischem Sinne vorgeschlagen⁵⁾. Da die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat in der inneren Mitochondrienmembran stattfindet, wurden Abfangreagentien wachsender Lipophilie eingesetzt²⁾, um das hypothetische Intermediat abzufangen. Über die Synthese dieser Abfangreagentien wird im folgenden berichtet.

¹⁾ Korrespondenz bitte an diesen Autor richten.

²⁾ Meinem verehrten Lehrer Professor Theodor Wieland zu seinem 65. Geburtstag gewidmet.

³⁾ R. Kiehl, Teil der Diplomarbeit Univ. Heidelberg 1975, und Doktorarbeit Univ. Heidelberg 1977.

⁴⁾ E. Bäuerlein und R. Kiehl, FEBS Lett. 61, 68 (1976).

⁵⁾ L. W. Cunningham, Biochemistry, 11, 1629 (1964).

⁶⁾ E. Bäuerlein, in Glutathione (L. Flohé, H. Ch. Benöhr, H. Sies, H. D. Waller und A. Wendel), 1. Aufl., S. 44ff., Thieme, Stuttgart 1974.

⁷⁾ Th. Wieland und E. Bäuerlein, Angew. Chem. 80, 915 (1968); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 7, 893 (1968).

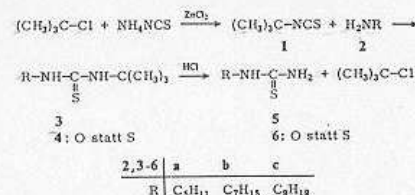
676

E. Bäuerlein und R. Kiehl

1978

1-(n-Alkyl)thioharnstoffe 5

Die Synthese von 5a-c folgt im wesentlichen derjenigen, die Nair⁶⁾ für Verbindungen vom Typ 5 mit R bis C₄H₉ beschrieben hat. Die Zwischenverbindungen 3 fallen dabei nahezu quantitativ an und werden als Rohprodukte direkt eingesetzt.

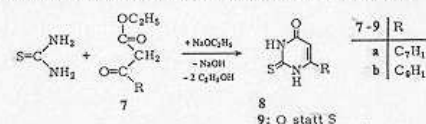


Als Vergleichssubstanz für die biochemischen Untersuchungen wurde Nonylthioharnstoff (5c) analog über 1-tert-Butyl-3-nonylthioharnstoff (4c) synthetisiert.

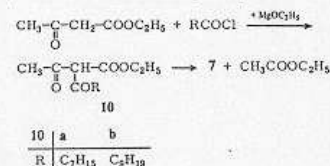
Die Anomalie ihrer ¹H-NMR-Spektren hat zu einer eingehenden Untersuchung der Konformation der Verbindungen 5 geführt, über die in einer weiteren Arbeit⁷⁾ berichtet wird.

6-(n-Alkyl)-2-thiouracile 8

Die bisher unbekannten, längerketigen 6-(n-Alkyl)-2-thiouracile 8 wurden durch Kondensation von Thioharnstoff mit dem entsprechenden β-Ketocarbonsäureestern nach Anderson und Mitarbeitern⁸⁾ dargestellt.



Die höheren β-Ketocarbonsäureester 7 wurden aus rohem 2-Acetyl-2-acylessigsäure-ethylester 10 durch Hunsdiecker-Spaltung und Hochvakuumdestillation



⁶⁾ G. V. Nair, Indian J. Chem. 4, 516 (1966).

⁷⁾ E. Bäuerlein und H. Trasch, Liebigs Ann. Chem., Veröffentlichung in Vorbereitung.

⁸⁾ G. W. Anderson, I. F. Halverstadt, W. H. Miller und R. O. Roblin, Jr., J. Am. Chem. Soc. 67, 2197 (1945).

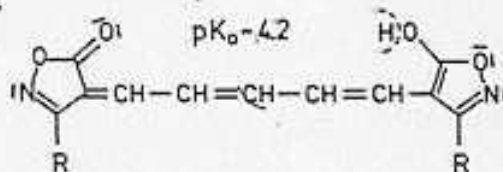
protonmotive force electrical comp. concentration comp.

$$\Delta p = \Delta \bar{\mu}_{H^+} = \Delta \psi - \underbrace{2.303 \frac{RT}{F}}_{-60\text{mV at } 30^\circ\text{C}} \Delta \text{pH}$$

transmembr.
proton gradient

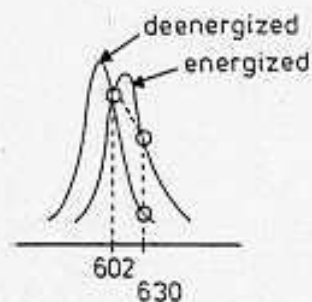
$$\Delta p = \Delta \psi - 60 \Delta \text{pH}$$

A) $\Delta \psi$:

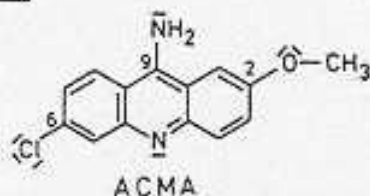


oxonol V, R = $\odot$

oxonol VI, R = $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

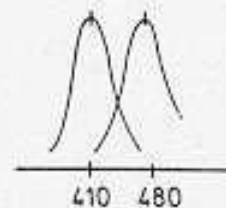


B) ΔpH :

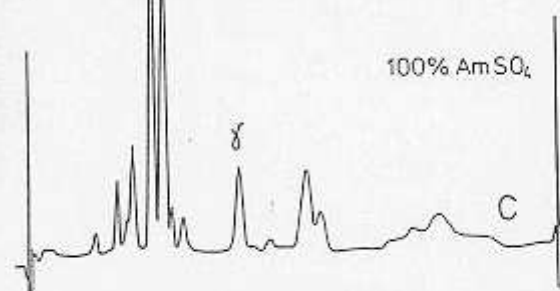
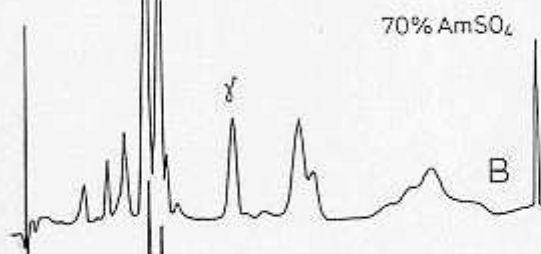
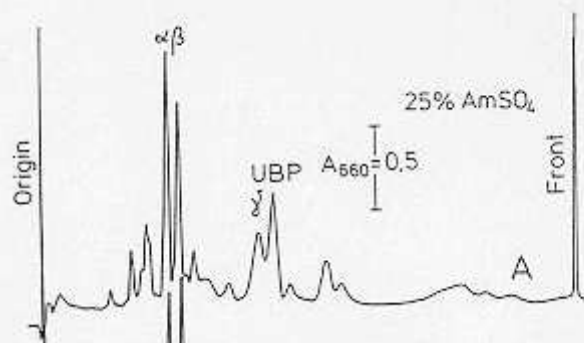


Excitation : 410nm

Emission : 480nm



9 - amino - 5 - chloro - 2 - methoxy - acridin



1) DCCD-sens. ~ 50%
2) cold labile
3) $\text{ATP} \rightarrow \text{P}_i^{32}$ -exchange
~ 50 - 200 $\mu\text{moles/mg}$

Bovine Mitochondrial ATP Synthase Complex
Subunit Composition and Stoichiometry (Hatefi, 1992)

Subunit	Molecular Weight	mol/mol of enzyme
α	55,164	3
β	51,595	3
γ	30,141	1
δ	15,065	1
ϵ	5,652	1
σ^*	24,816 / + ~26 kDa	?
b	24,668	2
OSCP	20,967	1
d	18,603	1
F_6	9,006	2
$\Delta 62^* (8)$	7,965	1
c (DCCD)	7,402	?
IP_3	9,578	1
+ e (Walker, 1991)		

*mtDNA encoded.

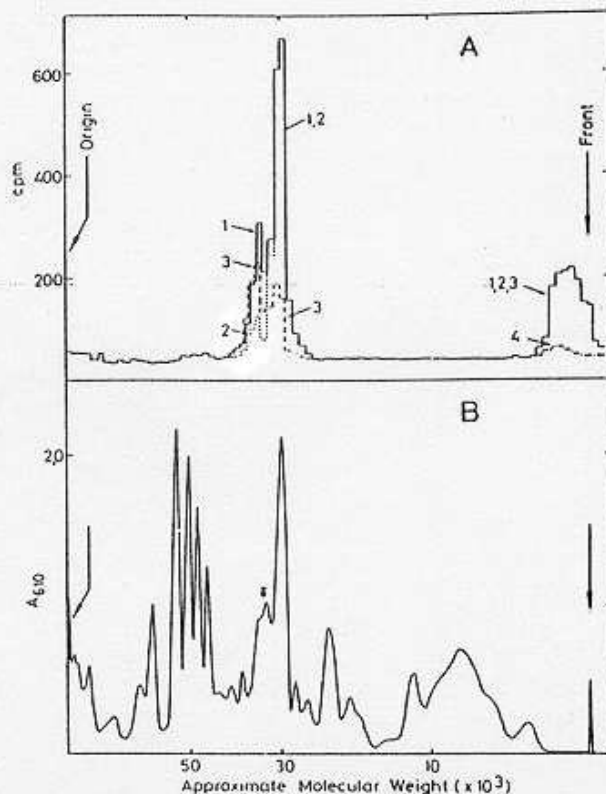


Fig.1. Distribution of radioactivity due to $[^{14}\text{C}]$ NSPM in 117 μg submitochondrial particles (A), and distribution of the particle protein (B). Submitochondrial particles were incubated as follows: 0.88 mg particles were added to 1 ml solution containing 0.25 M sucrose, 50 mM Tris-acetate, 30 mM MgCl_2 , 40 mM phosphate, 12.5 mM ATP (pH 7.5) at 0°C . (1) (solid line) $[^{14}\text{C}]$ NSPM was added after 10 min incubation at 0°C and 1 min at 37°C to 20 nmol/mg protein and the reaction stopped after 2 min at 37°C with 1 mM cysteine. (2) (dotted line) as (1) but 10 min preincubation of the particles at 0°C and 1 min at 37°C with 230 nmol diamide/mg protein. (3) (dashed line) as (2) but preincubation with 26 nmol CAT/mg protein. The protein distribution pattern of submitochondrial particles is unchanged by the incubation procedures, the scan shown in fig.1B corresponds to fig.1A, trace 3.

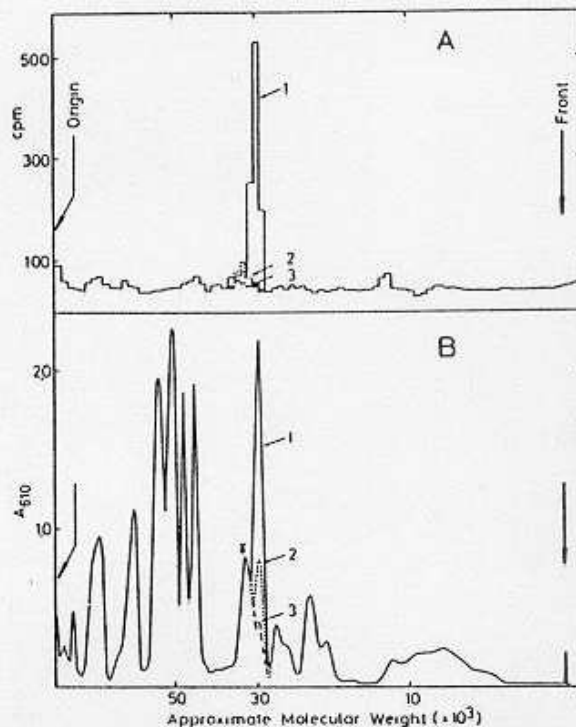
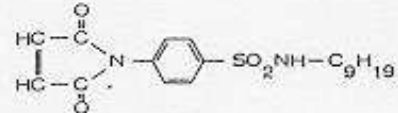
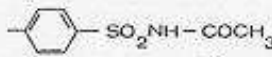
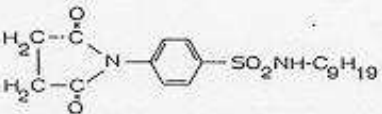


Fig.2. Distribution of radioactivity due to $[^{14}\text{C}]$ NSPM in 93 μg ATPase protein (A), and distribution of ATPase protein (B). Conditions as in fig.1. (a) (solid line) 50 nmol $[^{14}\text{C}]$ NSPM/mg Serrano-type ATPase protein. (2) (dotted line) as (1) but preincubation of the ATPase with 60 nmol CAT/mg protein. (3) (dashed line) as (1) amount of radioactivity and mol. wt 30 000 band in complex V preparations.

Table 1
Effects of various N-substituted maleimides on the respiration of ox heart mitochondria with glutamate + malate as substrates

No.	Formula	Abbr.	Inhibition of state 4 → state 3 transition (nmoles/mg protein)	Respiration inhibition (nmoles/mg protein)
Ia		NSPM	12 - 16	90 - 110
Ib		ASPM	without effect up to 50	110 after addition of ADP
III	-C9H19	NNM	60 +30% stimulation of state 4 respiration	-
IV	-C2H5	NEM	without effect up to 50	200 (50%)
II		NSPS	without effect up to 50	120

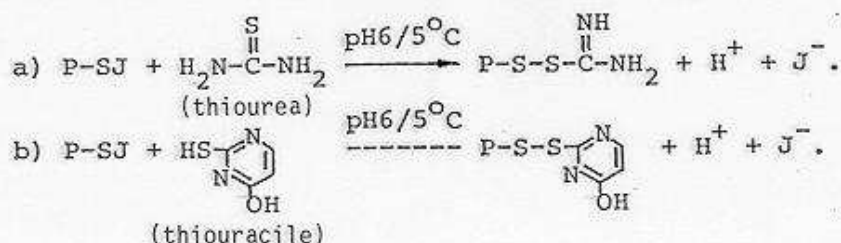
The conditions are the same as described in fig.1 for the experiments A and D. The concentrations indicate maximal inhibition, unless otherwise indicated. Maximal inhibition of respiration means the same degree of inhibition as with 0.6 mM KCN.

Table 2
Effects of various N-substituted maleimides on the respiration of ox heart mitochondria with succinate

No.	Abbreviation	uncoupling (nmoles/mg protein)	Inhibition of state 4 → state 3 transition (nmoles/mg protein)
Ia	NSPM	20-26	-
Ib	ASPM	no effect	110
III	NNM	120	-
IV	NEM	without effect up to 300	-
II	NSPS	no effect	170 +50% stimulation of state 4 respiration

The conditions are the same as described in fig.1 for experiment B. The concentrations indicate either maximal uncoupling, i.e. state 3 respiration, or maximal respiration inhibition, i.e. inhibition as with 0.6 mM KCN.

Reaction between B-lactoglobulinsulfenyl iodide and sulfenylreagents



Das gemischte Disulfid aus b) wurde am Umsatz mit $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Thiouracil und anschließender Fraktionierung an Sephadex G-25 verfolgt. Es ist zu bemerken, daß das Disulfid in Lösung nur bei sauren pH-Werten und nicht zu hohen Temperaturen einigermaßen stabil ist.

Die neu synthetisierten lipophilen Thioharnstoffe und Thiouracile testete ich analog dem Verfahren von Cunningham.

Reaction rates between B-lactoglobulinsulfenyl iodide and

a) thioureas

b) thiouraciles

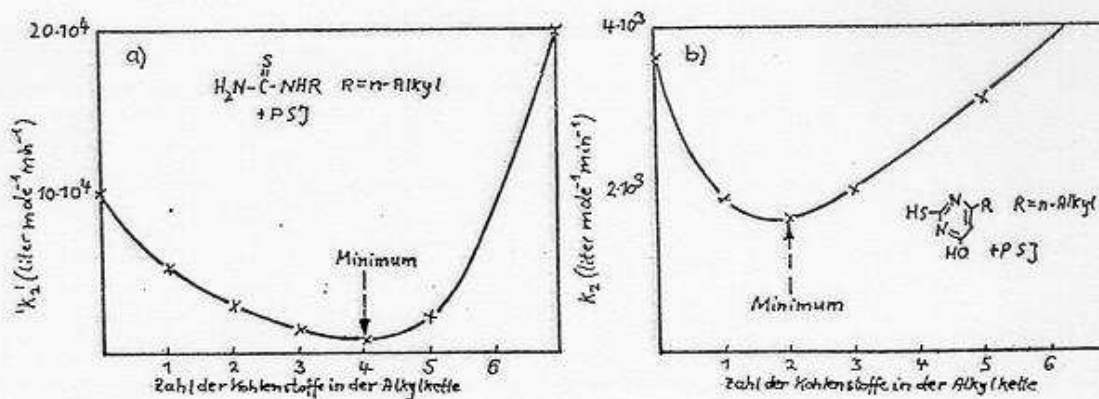
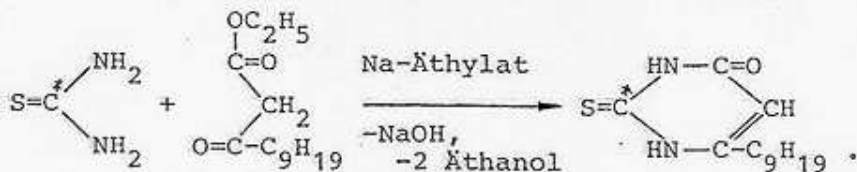


Fig.7: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Alkylseitenkette (Lipophilie) der getesteten Thioharnstoffe (a) Thiouracile (b) [50].

Der n-Heptyl-Thioharnstoff, sowie das n-Heptyl-Thiouracil erwiesen sich als die am schnellsten reagierenden Reagentien, der

Aus der Promotion (1976):

Synthesis of radioactive labeled 6-n-nonyl-2-thiouracile



¹⁴C-thiourea or ³⁵S-thiourea + β-Ketoester rial dienen ¹⁴C-thiouracile or ist als ³⁵S-
 35S-thiourea + β-Ketoester dung nicht ³⁵S-thiouracile aktion kann in
 einer Stufe durchgeführt werden. Die Ausbeute liegt bei 90 %.

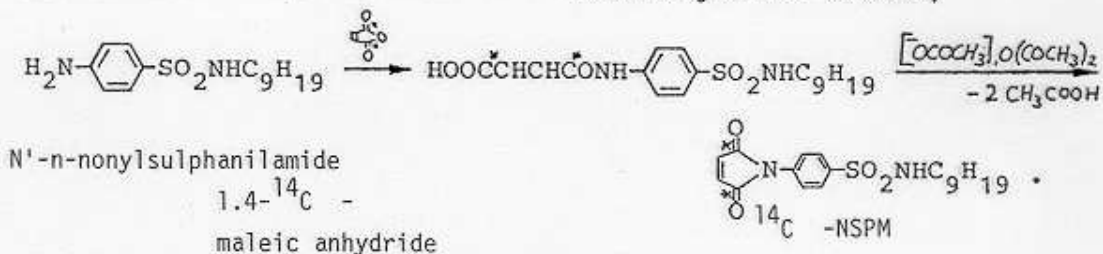
Ich entschloß mich daher, das Thiouracil-Derivat zu synthetisieren (Experiment. Teil) und verzichtete auf die Markierung des Thioharnstoffes, was wohl in Anbetracht der in etwa gleichen Wirkung auf die Mitochondrien gut zu vertreten ist.

2.1,4-¹⁴C-NSPM: N⁴-(N¹-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-[1,4-¹⁴C]-maleinimid

Das am besten reagierende Thiolreagenz war NSPM.

Die ¹⁴C-Isotopen-Markierung von NSPM kann in 2 Stufen mit

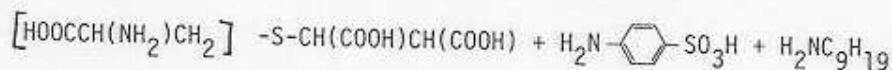
Synthesis of radioactive labeled NSPM ches preiswert zu kaufen ist, mit
 1 durchgeföhrt werden,



NSPM-reaction with thiols



hydrolysis (6N HCl, 20 hrs at 110°C)



S-(1,2-dicarboxyethyl)L-cysteine + sulfanilic acid + n-nonylamine

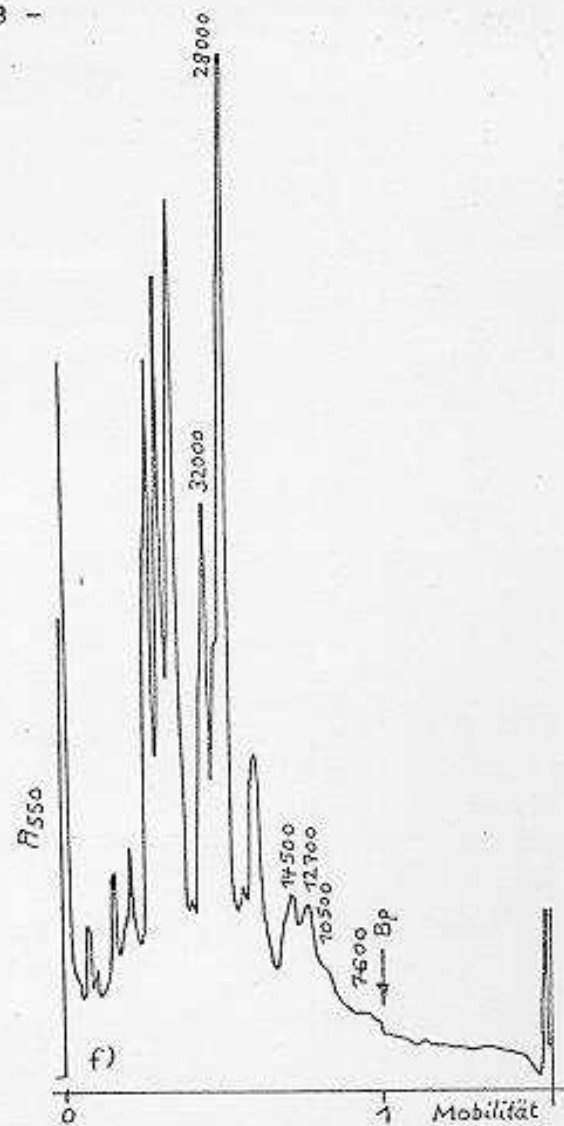
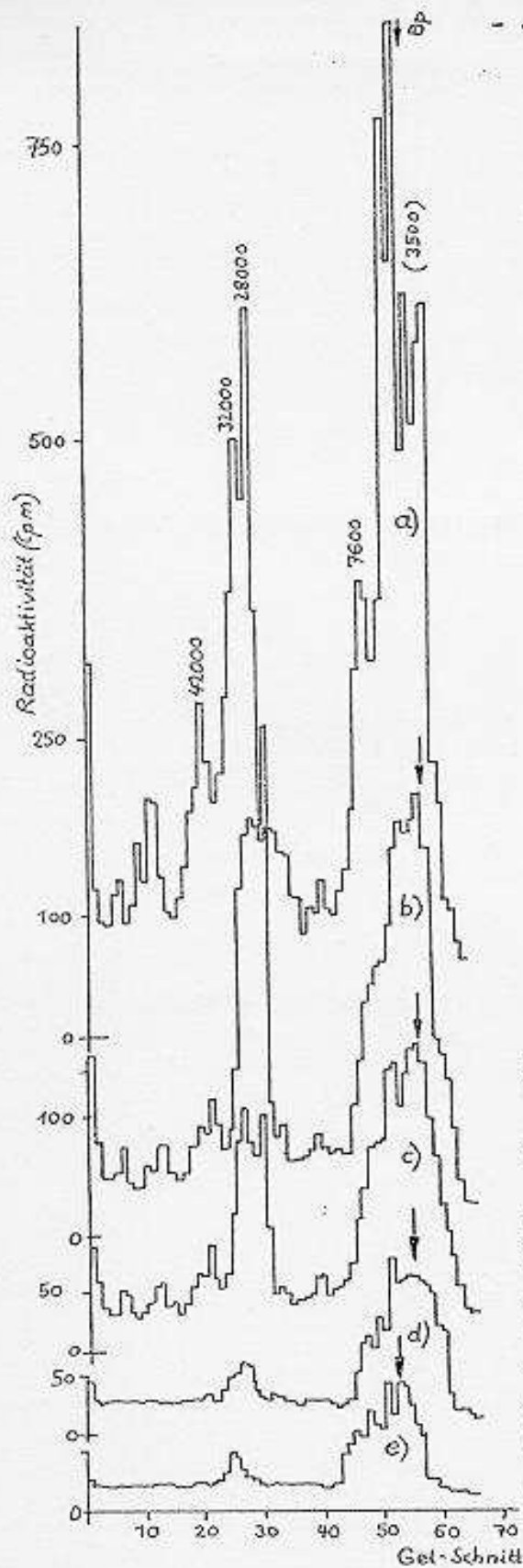


Fig.17: f) Densitometerkurve

Elektr.Bed.: analog Fig.16; A.96 μ gPr

- a) Radioaktivitätsvert. in SDS-Polyacrylamid-Gels nach Elektrophorese von 14 C-NSPM inkub. Mitoch., 70,7 nMol/mg Prot.; A.: 160 μ g Prot.
 b) analog a) 14,14 nMol/mg Prot.;
 c) analog a) 9,43 nMol/mg Prot.;
 d) analog a) 4,7 nMol/mg Prot.;
 e) analog a) 1,9 nMol/mg Prot.,
 A.: 320 μ g Protein.

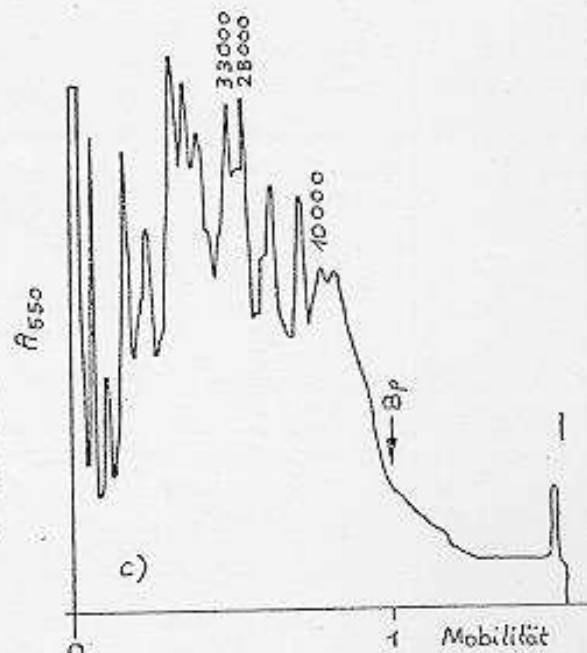
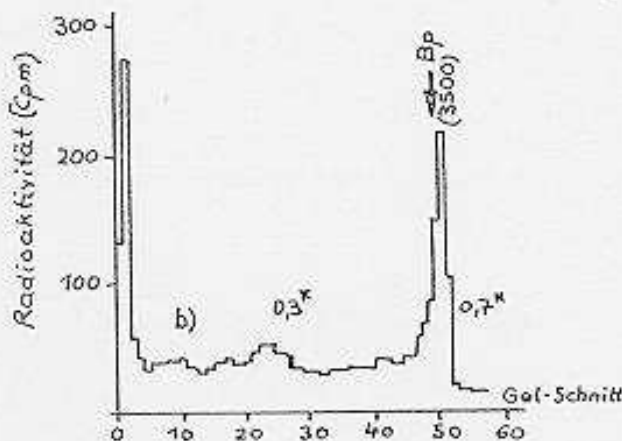
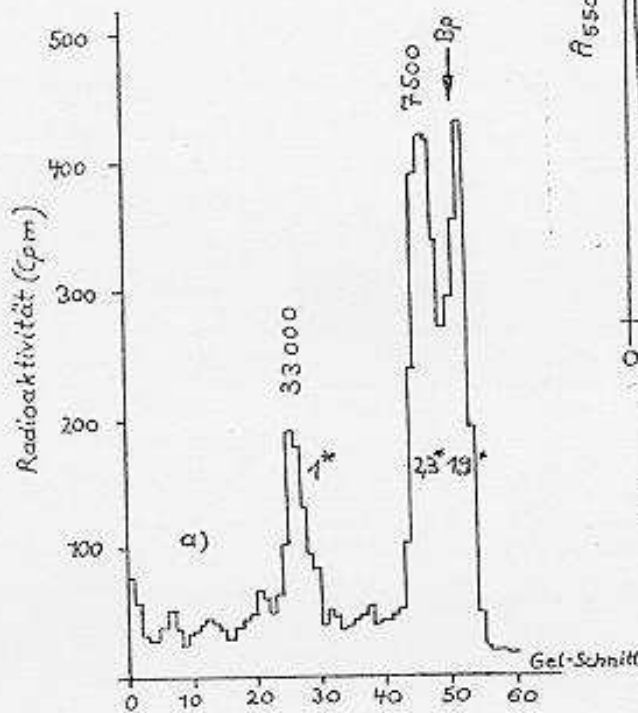


Fig. 18: c) Densitometerkurve

Elektrophorese-Bedingungen:
analog Fig. 16; Auftrag: 200 μ g P.

a) Radioaktivitätsverteilung
in SDS-Polyacrylamid-Gels
nach Elektrophorese von
 14 C-NSPM inkub. Mitochondr.,
6,9 nMol/mg Protein;
*Die Zahlen an den Peaks
bedeuten nMol/mg Protein.

b) Restaktivität nach
Äthanol-Behandlung von a).

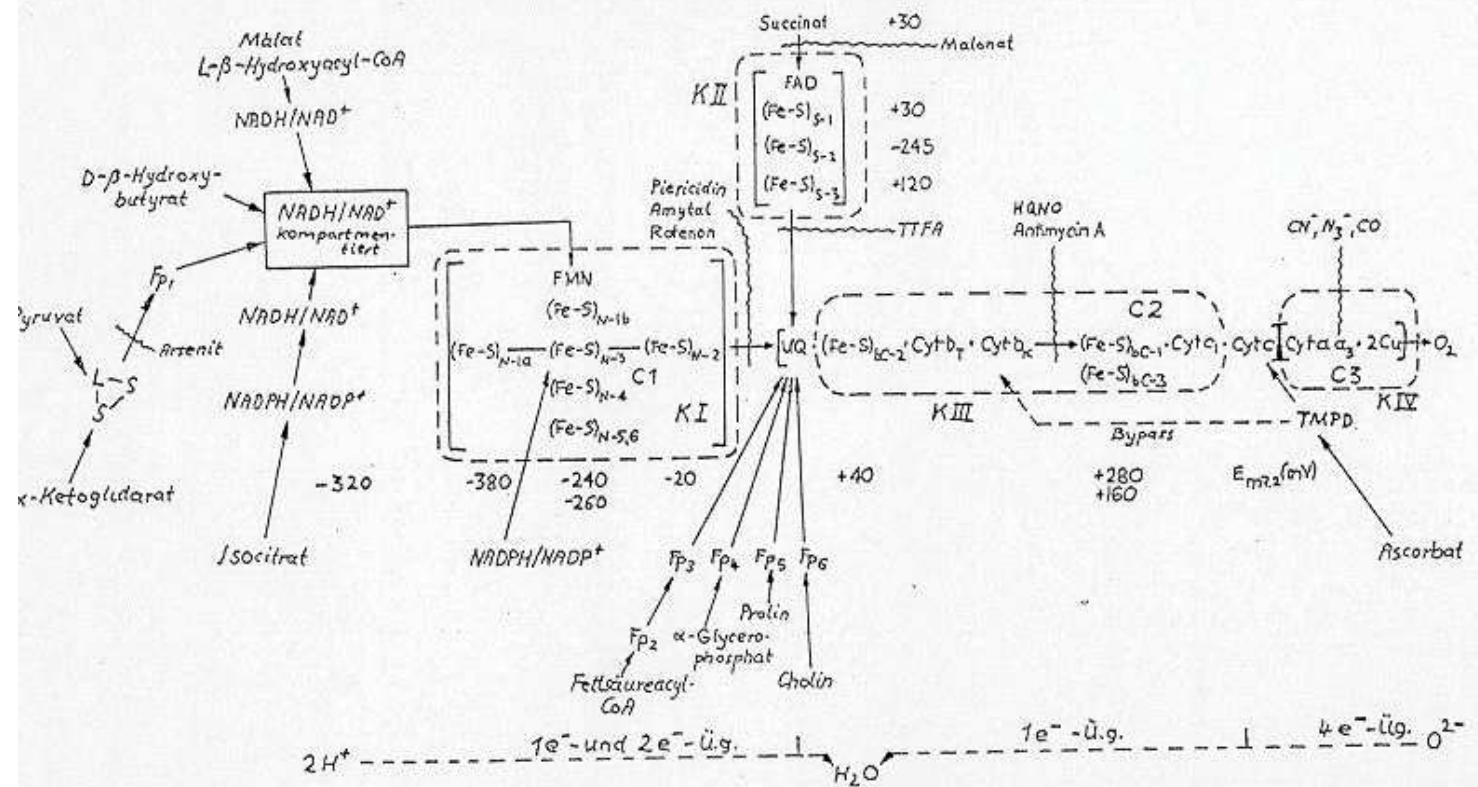


Abb. 1: Schema der Atmungskette. Fe-S = Eisen-Schwefel-Center, Fp₁₋₆ = Flavoproteine, UQ = Ubichinon, Cyt = Cytochrome, HQNO = 2-Heptyl-4-Hydroxyquinolin-N-oxyl, TTFA = Thenoyl-trifluoracetat, C 1-3 = Kopplungsstellen, K I-IV = Komplexe, U.g. = Übergänge. Lit. [43,65].

SEPTEMBER 1, 1997

TIME

MONTSERRAT
Death of an Island

The Agony Of Asthma

AUSTRIA 5.45.00 GERMANY 6.90.00 SWITZERLAND 7.50.00 U.S. ADULT (INCL. POSTAGE) \$7.25