

correlate of the 'strongly fluorescent bulges' described in the periphery⁴. These possibly represent the site of accumulation of storage vesicles where the axon is interrupted.

The dual action of 6-hydroxydopamine remains to be clarified. The compound, owing to its chemical similarity to dopamine, might be transported into the catecholaminergic nerve endings by the same specific mechanism as the endogenous catecholamines. As a consequence, 6-hydroxydopamine would accumulate in the nerve terminals and may replace the endogenous catecholamines and/or inhibit their synthesis (see above). As long as the intraneuronal concentration of 6-hydroxydopamine and/or its potential metabolite 6-hydroxynorepinephrine is relatively low (as after once 200 µg 6-hydroxydopamine), no ultrastructural changes appear. Higher intraneuronal concentrations of 6-hydroxycatecholamines (after twice 200 µg 6-hydroxydopamine) evidently cause in addition morphological damage. This might be due, for instance, to disruption of the tertiary and quaternary structure of proteins in the nerve endings, since 6-hydroxydopamine is a derivative of 6-hydroxyhydroquinone, a strong reducing agent.

In conclusion, 6-hydroxydopamine seems to have two main actions. A single dose decreases the cerebral norepinephrine and dopamine, possibly by acting as a false transmitter and/or by inhibiting catecholamine synthesis. Repeated doses, in addition, cause specific ultrastructural

lesions of the catecholaminergic neurons similar to those found in the peripheral sympathetic nervous system¹⁸.

Zusammenfassung. Im Gehirn von Ratten bewirkt einmalige intraventrikuläre Injektion von 200 µg 6-Hydroxydopamin nach 2 und 5 Tagen eine deutliche Verminderung von Noradrenalin und Dopamin, während 5-Hydroxytryptamin nur geringfügig herabgesetzt wird. Elektronenmikroskopisch sind keine strukturellen Veränderungen festzustellen. Zweimalige Injektion von 200 µg 6-Hydroxydopamin führt dagegen zu schweren spezifischen Degenerationen im Bereich des Nucleus caudatus und Hypothalamus. Daraus wird geschlossen, dass niedrige Dosen 6-Hydroxydopamin die cerebralen Catecholamine vermindern können, ohne ultrastrukturelle Schädigungen des Gehirns zu verursachen.

G. BARTHOLINI, J. G. RICHARDS
and A. PLETSCHER

Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche and Co. AG,
CH-4002 Basel (Switzerland), 3 November 1969.

¹⁸ W. P. BURKARD, M. JALFRE and J. BLUM, *Experientia* 25, 1295 (1969).

Carotenoids of *Betaeus harfordi* (Crustacea: Decapoda)¹

Betaeus harfordi is a small shrimp which lives in the mantle cavity of abalone. It occurs along the coast of California and part of Mexico in all species of *Haliotis* but most commonly in the pink abalone, *Haliotis corrugata*².

The present investigation was undertaken for the purpose of characterizing the total carotenoid pigments of *Betaeus harfordi* and to determine the carotenoid moiety of the supposed caroteno-protein which causes the deep blue-purple external body color.

Methods. Animals which had been starved for 5 days were used for the study. The carotenoids were extracted with ethanol and washed thence by dilution into hexane. Absorption spectra were determined on a Bausch and Lomb spectronic 505 recording spectrophotometer. Thin-layer chromatography was conducted upon silica gel H using eluants composed of 15% acetone in hexane (v/v) for zones 1–4 and 25% acetone in hexane for zone 5. The carotenoids were identified by (1) absorption maxima, (2) behavior before and after saponification, (3) partition

coefficients between 95% methanol and hexane³, and (4) co-chromatography with authentic samples. The carotenoid chromoprotein was extracted in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2), filtered, and centrifugated at 27,000 g for 1 h in the cold to remove non-colloidal particulate matter.

Results. The nature and relative amounts of the carotenoids found are recorded in the Table, together with absorption maxima in hexane and partition coefficients both before and after treatment with alcoholic alkali. Zone 1 did not separate from synthetic β -carotene when the 2 compounds were co-chromatographed. Zone 2 was

¹ Contribution from the Scripps Institution of Oceanography. This research was supported by Research Grant No. GB-5332x-1 from the National Science Foundation awarded to Dr. D. L. Fox.

² J. F. L. HART, *Proc. U.S. Nat. Museum* 115, 431 (1964).

³ F. J. PETRACEK and L. ZECHMEISTER, *Analyt. Chem.* 28, 1484 (1956).

Carotenoids found in *Betaeus harfordi*, listed in order of increasing adsorption on silica gel thin layer

Pigment	% of total	λ_{max} A ^a (hexane, nm)	B ^b		Partition coefficients between hexane and 95% methanol	
			A ^a	B ^b	A ^a	B ^b
β -carotene	4.2	470, 442, ~422	470, 442, ~422		100:0	100:0
Echinenone	2.2	~476, 450	—		epiphasic	epiphasic
Astaxanthin ester	37.6	464	466		93:7	25:75
Astaxanthin ester	35.8	464	466		74:26	25:75
Astaxanthin	20.2	464	466		13:87	25:75

^a Before saponification. ^b After saponification.

not found in sufficient yield for positive identification but the absorption curve and partition behavior after saponification suggest the possibility of echinenone. Zones 3 and 4 were identified as astaxanthin esters by their single rounded absorption maximum at 464 nm, their characteristic interfacial 'red muff' observed when the saponified fraction in diluted ethanolic alkali was shaken with hexane^{4,5}, and their partition coefficients both before and after saponification. Final evidence was obtained by co-chromatography of the saponified fractions with authentic astacene. Zone 5 did not separate from free astaxanthin when co-chromatographed. After alkaline treatment, its properties were identical to those of saponified zones 3 and 4. Visible light absorption of the carotenoprotein solution showed a broad single rounded maximum at 480 nm. Upon addition of alcohol, the blue solution turned orange. Subsequent thin-layer chromatography resulted in a single pink zone, the properties of which indicated astaxanthin. Its identity was confirmed by mixed chromatography with authentic astaxanthin.

It is not surprising that astaxanthin and its esters comprise 93.6% of the total carotenoids of *Betaeus harfordi*, for crustaceans in general have been shown to contain astaxanthin in abundance⁶. The fact that the chromo-

protein involves unesterified astaxanthin as the carotenoid moiety is also not unexpected since it is the most common protein-associated carotenoid in the Malacostraca⁷.

Zusammenfassung. Die Carotinoide der Garnele *Betaeus harfordi* bestehen zu über 93% aus Astaxanthin und seinen Estern. Die tiefblaue äusserliche Farbe wird durch ein Chromoprotein mit unverestertem Astaxanthin gebildet.

J. W. MCBETH

*Division of Marine Biology,
Scripps Institution of Oceanography,
La Jolla (California 92037, USA), 29 September 1969.*

⁴ D. L. FOX, Comp. Biochem. Physiol. 6, 306 (1962).

⁵ D. L. FOX and T. S. HOPKINS, Comp. Biochem. Physiol. 19, 268 (1966).

⁶ T. W. GOODWIN, in *Physiology of Crustacea* (Ed. T. H. WATERMAN; Academic Press, New York 1960), vol. 1, p. 120.

⁷ D. F. CHEESEMAN, W. L. LEE and P. F. ZAGALSKY, Biol. Rev. 42, 135 (1967).

Irreversible synthetische Inhibitoren der Urokinase

Zur Charakterisierung des plasminogenaktivierenden Fermentes aus Harn, Urokinase, sind in mehreren Untersuchungen synthetische Inhibitoren eingesetzt worden. Als kleinstmolekulare Inhibitoren der Urokinase erwiesen sich die als «synthetische Antifibrinolytika»¹ bekannten Verbindungen ϵ -Aminocapronsäure, 4-Aminomethylbenzoesäure und *trans*-4-Aminomethylcyclohexancarbonsäure¹⁻⁴, die neben Urokinase auch andere plasminogenaktivierende Fermente hemmen. Im Rahmen neuerer Untersuchungen⁵ über den Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen wurde gezeigt, dass Benzylamin- und Benzamidinderivate, die sich schon als kompetitive Hemmstoffe des Trypsins, Plasmins, Thrombins und Kallikreins erwiesen haben⁶⁻¹¹, auch die Urokinase kompetitiv zu hemmen vermögen. Weitere Aufschlüsse über die Struktur des aktiven Zentrums der Urokinase sind von der Umsetzung des Fermentes mit bekannten und neuentwickelten¹² irreversiblen Inhibitoren der genannten proteolytischen Fermente zu erwarten.

In der vorliegenden Untersuchung wurden folgende Inhibitoren benutzt: Diisopropylfluorophosphat (DFP): Handelspräparat (Boots Pure Drug Co. Ltd., Nottingham, England); N α -Tosyl-L-lysinchloromethylketon (TLCK): Handelspräparat (Calbiochem, Luzern, Schweiz)¹³; 4-Guanidinobenzoesäure-4'-nitrobenzylester (GBNB)¹⁴. Die verwendete Urokinase (Handelspräparat der Leo Pharmaceutical Products, Kopenhagen, Dänemark), besass eine spezifische Aktivität von 8000 Ploug-Einh./mg. Zur Aktivitätsbestimmung der Urokinase wurde das von WALTON⁴ beschriebene Estersubstrat N α -Acetylglucyl-L-lysinmethylester (AGLME)¹⁵ eingesetzt. Alle Substanzen wurden in carbonatfreier 0,155 M NaCl-Lösung gelöst.

3,0 ml Fermentlösung (800 Ploug-Einh./ml) und 3,0 ml Hemmstofflösung, beziehungsweise Ferment- und NaCl-Lösung in den Kontrollen, wurden zusammengegeben, die Reaktionsmischungen wurden auf pH 7,5 eingestellt und anschliessend bei 25°C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten

wurden Proben von je 1,0 ml aus den Reaktionsansätzen entnommen und zu 4,0 ml Substratlösung zugegeben. Die Substrathydrolyse wurde durch potentiometrische Titration bei pH 7,8 (pH-Optimum der Reaktion)⁴ und 25°C unter gereinigtem Stickstoff verfolgt. Es wurde der Alkaliverbrauch in 150 sec bei einer AGLME-Konzentration von $5 \times 10^{-4} M$ bestimmt. Auf diese Weise wurden

¹ Übersicht bei F. MARKWARDT und H. LANDMANN, *Antifibrinolytika* (VEB Gustav Fischer, Jena 1967).

² N. ALKJAERSIG, A. P. FLETCHER und S. SHERRY, J. biol. Chem. 234, 832 (1959).

³ L. LORAND und E. V. CONDIT, Biochemistry 4, 265 (1965).

⁴ P. L. WALTON, Biochim. biophys. Acta 132, 104 (1967).

⁵ H. LANDMANN und F. MARKWARDT, Thromb. Diathes. haemorrh., im Druck.

⁶ H. LANDMANN, F. MARKWARDT, H.-G. KAZMIROWSKI und P. NEULAND, Z. physiol. Chem. 348, 745 (1967).

⁷ F. MARKWARDT und P. WALSMANN, Experientia 24, 25 (1968).

⁸ F. MARKWARDT, H. LANDMANN und P. WALSMANN, Europ. J. Biochem. 6, 502 (1968).

⁹ M. MARES-GUIA und E. SHAW, J. biol. Chem. 240, 1579 (1965).

¹⁰ J. D. GERATZ, Arch. Biochem. Biophys. 118, 91 (1967).

¹¹ M. MARES-GUIA und C. R. DINIZ, Arch. Biochem. Biophys. 121, 750 (1967).

¹² F. MARKWARDT, M. RICHTER, H. LANDMANN und P. WALSMANN, Biochim. biophys. Acta, im Druck.

¹³ Das Präparat (N α -Tosyl-L-lysinchloromethylketon-hydrochlorid) wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. E. F. MAMMEN, Wayne State University, School of Medicine, Dept. of Physiology and Pharmacology, Detroit, USA, zur Verfügung gestellt.

¹⁴ Für die Synthese dieser Verbindung (4-Guanidinobenzoesäure-4'-nitrobenzylester-nitrat) danken wir Herrn Dr. KÜHMSTEDT, Sektion Biowissenschaften Bereich Pharmazie der Karl-Marx-Universität Leipzig; Bereichsleiter: Prof. Dr. G. WAGNER.

¹⁵ Für die Überlassung des Urokinasesubstrates N α -Acetylglucyl-L-lysinmethylester-acetat-H₂O danken wir Herrn Dr. V. MUTT, Kemiska Institutionen, Karolinska Institutet, Stockholm (Schweden).