

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).

praktisch Initialgeschwindigkeiten gemessen; die Hydrolysegeschwindigkeiten waren den Fermentkonzentrationen direkt proportional.

Es zeigte sich, dass die Urokinase-Aktivität bei Inkubation mit DFP oder GBNB in Abhängigkeit von der Inkubationszeit progressiv abnimmt. Die Inaktivierungsreaktionen verlaufen nach Art pseudomonomolekularer Reaktionen (Figur 1), was auf eine irreversible Inaktivierung des Fermentes durch die genannten Inhibitoren hindeutet. Geschwindigkeitskonstanten (k_2) wurden graphisch ermittelt. Sie sind in der Tabelle aufgeführt (Mittelwerte aus 3 Bestimmungen). GBNB bewirkt ausserdem eine kompetitive Hemmung der Urokinase ($K_i = 0,3 \text{ mMol/l}$)⁵. Der dadurch bedingte Einfluss des Inhibitors auf die Substrathydrolyse ist angesichts seiner niedrigen Konzentration im Hydrolyseansatz ($5 \times 10^{-6} \text{ M}$) jedoch zu vernachlässigen, wie in Kontrollexperimenten bestätigt wurde. Im Gegensatz zu DFP und GBNB bewirkt TLCK ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$) bei Inkubation mit Urokinase unter den angegebenen Bedingungen keine progressive Hemmung des Fermentes. Um die hohe Eigenhydrolyse dieses Inhibitors während der Inkubation bei pH 7,5 zu

verringern, wurden weitere Inkubationsversuche bei pH 6,5–6,8 durchgeführt. Die TLCK-Konzentration wurde dabei bis auf $2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ gesteigert. In keinem Falle war eine Urokinasehemmung festzustellen. Auch eine kompetitive Hemmung des Fermentes war bei TLCK-Konzentrationen bis 10^{-3} M nicht zu beobachten.

Die Hemmung der Urokinase durch DFP und GBNB wurde auch bei der Einwirkung des Fermentes auf sein natürliches Substrat Plasminogen in einem künstlichen Fibrinolyse-System untersucht. Zur Durchführung dieser Versuche wurden alle Substanzen in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, 0,05 M NaCl enthaltend, gelöst. 0,55 ml Urokinaselösung (5000 Ploug-Einh./ml) wurden mit 0,55 ml Hemmstofflösung, beziehungsweise 0,55 ml Pufferlösung in den Kontrollen, bei 25°C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben von je 0,2 ml aus den Inkubationsansätzen entnommen und zu 0,2 ml frischem Human-Citratplasma zugefügt, das unmittelbar darauf durch Zugabe von 0,1 ml Thrombinlösung (100 NIH-Einh./ml) zur Gerinnung gebracht wurde. Die Lysezeiten der entstandenen Plasmagerinnsel bei 37°C, das heisst die Zeit von der Thrombinzugabe bis zum Durchfallen einer nach Eintritt der Gerinnung auf die Gerinnsoberfläche aufgetragenen Glaskugel auf den Reagenzglasboden, wurden bestimmt.

Die Versuchsergebnisse sind in Figur 2 dargestellt. Auch unter diesen Bedingungen liess sich eine progressive Hemmung der Urokinase demonstrieren, wie aus der Verlängerung der Lysezeiten hervorgeht. Die erhaltenen Werte wurden an Hand von Urokinase-Eichkurven in Prozent Ferment-Restaktivität umgerechnet. Die daraus auf graphischem Wege ermittelten Geschwindigkeitskonstanten zeigen befriedigende Übereinstimmung mit den bei der Urokinasebestimmung mittels Esterhydrolyse ermittelten Werten (Tabelle). Ein kompetitiver Inhibitor der Urokinase, 4-Aminobenzamidin ($K_i = 0,015 \text{ mMol/l}$)⁶, bewirkt bei Inkubation mit dem Ferment keine progressive Inaktivierung.

Die dargelegten Untersuchungen erbringen erstmals den Nachweis für eine Hemmung der Urokinase durch DFP und lassen darauf schliessen, dass Urokinase wie bestimmte andere proteolytische Fermente eine Serinproteinase darstellt. Die DFP-Urokinase-Reaktion läuft mit grösserer Geschwindigkeit ab als die Reaktionen des gleichen Inhibitors mit Trypsin ($k_2 = 5,0 \text{ l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$, 25°C, pH 7,2)^{16,17} sowie Plasmin und Thrombin, wie aus eigenen Bestimmungen¹⁴ und aus den von MOUNTER et al.¹⁸ angegebenen Werten geschlossen werden kann. 4-Guanidinbenzoesäure-Ester sind als irreversible

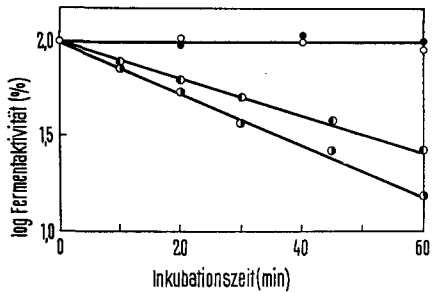


Fig. 1. Hemmung der esterolytischen Aktivität der Urokinase (400 Ploug-Einh./ml) bei Inkubation mit NaCl-Lösung (○—○); $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ DFP (●—●); $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ TLCK (●—●); oder $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ GBNB (●—●). pH 7,5; 25°C.

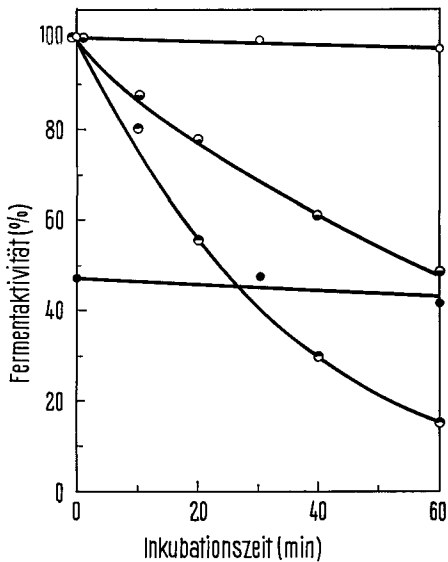


Fig. 2. Hemmung der plasminogenaktivierenden Aktivität der Urokinase (2500 Ploug-Einh./ml), gemessen an der Verlängerung der Lysezeit eines Plasmagerinnsels bei Inkubation mit NaCl-Lösung (○—○); $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ DFP (●—●); $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ GBNB (●—●); oder 4-Aminobenzamidin (●—●). pH 7,5; 25°C.

Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von Urokinase mit irreversiblen Inhibitoren (pH 7,5, 25°C)

Inhibitor	k_2	Fibrinolysetest
	$1 \times \text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$ Esterhydrolyse	
DFP	18,0 ($\pm 1,5$)	20,7
TLCK	$> 0,01$	—
GBNB	13,5 ($\pm 1,5$)	9,0

¹⁶ F. MARKWARDT, M. RICHTER, P. WALSMANN und H. LANDMANN, Europ. J. Biochem., im Druck.
¹⁷ D. E. FAHRNEY und A. M. GOLD, J. Am. Chem. Soc. 85, 348 (1963).
¹⁸ L. A. MOUNTER, B. A. SHIPLEY und M. E. MOUNTER, J. biol. Chem. 238, 1079 (1963).

Hemmstoffe des Trypsins, Plasmins und Thrombins beschrieben worden^{12, 13, 19, 20}. Die Reaktion von GBNB mit Urokinase erfolgt mit geringerer Geschwindigkeit als mit Trypsin und Plasmin¹². Nachdem bereits von anderen Autoren gezeigt worden ist, dass der irreversible Chymotrypsininhibitor N^α-Tosyl-L-phenylalaninchlormethylketon (TPCK) nicht mit Urokinase reagiert³, wurde nunmehr festgestellt, dass auch TLCK keine Hemmung des Fermentes bewirkt. Da eine Hemmung anderer plasminogenaktivierender Fermente durch TLCK nachgewiesen wurde²¹, deutet dieses Ergebnis auf bestehende Unterschiede in den aktiven Zentren derartiger Fermente hin.

Summary. Urokinase, the plasminogen activator from urine, is inhibited irreversibly by diisopropyl fluorophosphate and 4'-nitrobenzyl 4-guanidinobenzoate. The reactions of inhibition underlie pseudofirst-order kinetics.

Rate constants were estimated. Urokinase is not inactivated by incubation with tosyl-L-lysine chloromethyl ketone.

H. LANDMANN und F. MARKWARDT

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Akademie Erfurt, DDR-50 Erfurt (DDR), 6. Oktober 1969.

¹⁹ T. CHASE JR. und E. SHAW, *Biochemistry* 8, 2212 (1969).

²⁰ F. F. BUCK, C. W. HUMMEL und E. C. DE RENZO, *J. biol. Chem.* 243, 3648 (1968).

²¹ W. R. GROSKOPF, B. HSIEH, L. SUMMARIA und K. C. ROBBINS, *J. biol. Chem.* 244, 359 (1969).

A Dialysable Glutamine Hydrolysing Enzyme from Normal and Malignant Tissues

A previous report¹ had indicated the presence of a dialysable factor in the Ehrlich ascites cells, which could bring about a degradation of glutamine in vitro. It was, therefore, of interest to see if a similar phenomenon occurred in solid tumours also and compare it with kidney, a rich source of glutaminase. An attempt has also been made to determine the nature of the factor, obtained after dialysis.

Materials and methods. The animals, bearing a mouse fibro-sarcoma (MFS), described by WARAVDEKAR et al.², were killed 10 days after the tumour transplantation, by cervical dislocation. A 20% homogenate of the tumour tissue was prepared in cold calcium, free Krebs-Ringer solution. Kidney homogenates were also prepared in a similar manner. 5.0 ml of homogenates were dialysed against 30 ml of calcium, free Krebs-Ringer phosphate buffer, pH 7.4 at 4°C for 18 h. The dialysates were then lyophilized and reconstituted with water just before use.

All incubations were carried out in Ca-free Krebs-Ringer phosphate buffer, pH 7.4, containing 5 mM glutamine, in a conventional Warburg manometric apparatus at 37°C for 1 h. The ammonia produced was determined by the method of BRAGANCA et al.³. The results obtained were corrected for the non-enzymatic hydrolysis of the substrate due to the addition of K₂CO₃.

Protein determinations were carried out according to the method of SUTHERLAND et al.⁴.

Results. Table I shows that both the dialysates and the dialysed homogenates, obtained from tumour and kidney, can liberate ammonia from glutamine. The activity, however, was higher in the former than in the latter. As the dialysates also showed the presence of protein, we tried to determine the heat stability of this factor, by keeping the dialysates in boiling water for 10 min and then tested for their activities. Table I indicates that, whereas the kidney dialysate lost about 89% of its original activity, the tumour dialysate was inactivated to the time of about 50%.

It may be observed from Table II that the tumour dialysate was capable of hydrolysing up to 60 mM concentration of glutamine. On the other hand, the dialysate obtained from kidney produced maximum amount of ammonia at 20 mM substrate concentration.

The Figure indicates that the kidney dialysates, when incubated at varying pH levels from 5.0–8.8 in the

presence of 5 mM glutamine, showed peaks at 2 different pH vs: pH 5.0 and 8.0. But the tumour dialysate had the maximum activity at pH 8.0. In this case, however, the activity increased with increase in pH, till it attained the maximum at pH 8.0.

Table I. Effects of dialysates obtained from kidney and tumour on glutamine degradation

Tissues	Homogenate after dialysis	Dialysate	Dialysate (boiled for 10 min)
Kidney	893 ± 60	14,60 ± 100	156 ± 9
Tumour	1294 ± 100	17,60 ± 95	9411 ± 10

All values are µg NH₄⁺/100 mg protein.

Table II. Effects of dialysates on increasing concentrations of glutamine

Tissues	Glutamine concentration (mM)				
	5	10	20	40	60
Kidney	8,333 ± 100	5,238 ± 500	14,285 ± 1,560	13,095 ± 965	8,333 ± 250
Tumour	4,545 ± 410	7,575 ± 675	9,090 ± 828	25,000 ± 2,065	65,909 ± 5,100

Values indicated are µg NH₄⁺/100 mg protein.

¹ G. C. SHRIVASTAVA and J. H. QUASTEL, *Ind. J. Cancer* 2, 121 (1965).

² S. S. WARAVDEKAR and K. J. RANADIVE, *J. natn. Cancer Inst.* 18, 555 (1957).

³ B. M. BRAGANCA, J. H. QUASTEL and R. SCHUCHER, *Arch. Biochem. biophys.* 52, 18 (1954).

⁴ E. W. SUTHERLAND, C. F. CORI, R. HAYNES and N. S. OLSEN, *J. biol. Chem.* 180, 825 (1949).