

DIE HETEROGENITÄT DES CAERULOPLASMINS:  
ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG  
VON ZWEI CUPRO-PROTEINEN AUS HUMAN-SERUM

R. RICHTERICH, A. TEMPERLI UND H. AEBI

*Medizinisch-Chemisches Institut und Kinderklinik der Universität Bern (Schweiz)*

(Eingegangen am 7. Juni, 1961)

---

SUMMARY

*The heterogeneity of ceruloplasmin:  
isolation and characterization of two cupro proteins from human serum*

Ceruloplasmin isolated from human serum could be separated in two components (C-C and C-D) which showed marked differences concerning their physico-chemical properties. From sedimentation studies a molecular weight of 148000 was calculated for C-C and of 125000 for C-D. Fraction C-C contained 8 and C-D 6 moles Cu/mole enzyme. Different amounts of carbohydrates were found in both forms (C-C, 7%; C-D, 3.2%). The different behaviour in the electrophoretic mobility on starch gel as well as in the immuno-electrophoresis gave further evidence that two distinct forms of ceruloplasmin exist. The possibility that fraction C-D may serve as a precursor of C-C has been discussed.

---

EINLEITUNG

HOLMBERG UND LAURELL<sup>1</sup> beschrieben 1948 ein blaues, kupferhaltiges Plasma-Protein, das sie später mit der seit über 20 Jahren bekannten Serum-Oxydase identifizierten<sup>2</sup>. Wiederholte Versuche reine Caeruloplasmin-Präparate herzustellen misslangen. Dies war offenbar darauf zurückzuführen, dass das Enzym in mehreren molekularen Spezies vorkommt. Durch Säulen-Chromatographie auf Hydroxylapatit gelang es BROMAN<sup>3</sup> zwei Serum-Fractionen mit Oxydase-Aktivität zu trennen. MORELL UND SCHEINBERG<sup>4</sup> bestätigten die Heterogenität des Caeruloplasmins und wiesen nach, dass die Hauptfraktion C-C\* homogen, die Nebenfraktion C-D jedoch mikro-heterogen ist. Beide Enzyme wiesen, bezogen auf das Eiweiss, denselben Kupfergehalt und dieselbe enzymatische Aktivität auf.

Die Ursache dieser Heterogenität ist nicht klar. CURZON UND VALLET<sup>5</sup> deuten sie als Artefakt. MORELL UND SCHEINBERG<sup>4</sup> führen sie, wie dies für die Haptoglobine und Siderophile feststeht, auf genetische Unterschiede zurück. Diese Hypothese konnten wir durch die Analyse einer grösseren Zahl von Seren auf ihre C-C und C-D-

---

\* MORELL UND SCHEINBERG<sup>4</sup> bezeichnen die homogene Hauptfraktion als C, die mikro-heterogenen Nebenfraktionen als D (D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>). Zur besseren Unterscheidung von den Transferinen ziehen wir die Abkürzungen C-C (Caeruloplasmin C) und C-D (Caeruloplasmin D) vor<sup>6,7</sup>.

Konzentration ausschliessen<sup>6</sup>. Einzig bei der hepato-lentikulären Degeneration (Wilson'sche Krankheit) liegt möglicherweise eine genetisch determinierte Gesetzmässigkeit vor. Bei allen anderen Individuen fanden wir eine direkte Beziehung zwischen der C-C und C-D-Konzentration. Bei stark gesteigerter Caeruloplasmin-Synthese (Herz-Infarkt, Gravidität, Krebs) schien jedoch die Konzentration von C-D stärker anzusteigen als diejenige von C-C. Beim Neugeborenen überwiegt quantitativ C-D, während beim Erwachsenen etwa 75% des Caeruloplasmins auf C-C zurückzuführen ist<sup>7</sup>. Unsere Beobachtungen schliessen somit sowohl eine Artefakt-Bildung wie auch eine genetisch determinierte Individualität aus. Zur besseren Klärung dieser Verhältnisse schien es angezeigt, eine einfache Methode zur Isolierung der beiden Isoenzyme auszuarbeiten und die molekularen Unterschiede zu analysieren.

#### METHODEN

Die N-Bestimmung erfolgte durch feuchte Veraschung im Mikro-Kjeldahl und kolorimetrische Messung des freigesetzten Ammoniaks mit dem Nessler-Reagenz. Die Umrechnung auf den Eiweiss-Gehalt erfolgte mit Hilfe der Formel: Eiweiss =  $N \times 6.25$ . Die direkte Bestimmung des Eiweiss-Gehaltes wurde nach der Methode von Folin-Ciocalteu in der Ultramikro-Modifikation von LOWRY<sup>8</sup> vorgenommen, wobei 90% reines Human-Albumin als Standard diente. Bei der Auswertung Säulenchromatographischer Fraktionen wurde die Eiweiss-Konzentration durch Bestimmung der Extinktion bei 280 m $\mu$  in einem Beckman DU oder Zeiss PMQ II Spektralphotometer ermittelt, wobei der Berechnung folgende Formel zu Grunde gelegt wurde:

$$E_{1\%, 1\text{ cm}}^{280\text{ m}\mu} = 1.65.$$

Zur Kupfer-Bestimmung wurde zunächst mit einem Gemisch von konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoff-Peroxyd feucht verascht und anschliessend das Kupfer kolorimetrisch mit Oxalyldihydrazid nach der Methode von STARK UND DAWSON<sup>9</sup> bestimmt. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Proben auch nach trockener Veraschung polarographisch oder kolorimetrisch mit Natriumdiäthyl-dithiocarbamat gemessen<sup>10</sup>.

Die Bestimmung der Gesamt-Kohlehydrate erfolgte mit der Anthron-Methode unter Verwendung von Glucose als Standard<sup>11</sup>.

Eine direkte Messung der Caeruloplasmin-Konzentration ist bei angereicherten Proben auf Grund der intensiven Blaufärbung dieses Cupro-Proteines möglich. Die Messung erfolgt im Beckman DU oder Zeiss PMQ II Spektralphotometer bei 605 m $\mu$  vor und nach Zusatz von 10 mg Ascorbinsäure. Als Grundlage für die Berechnung diente die Formel  $E_{1\%, 1\text{ cm}}^{605\text{ m}\mu} = 0.56$ .

Die Bestimmung der Oxydase-Aktivität erfolgte durch Messung der Extinktionszunahme bei 546 m $\mu$  (Eppendorf-Photometer) während der Inkubation mit *p*-Phenylendiamin als Substrat. Der Test-Ansatz (3 ml) hatte folgende Zusammensetzung: Acetat-Puffer pH 6.0, 60 mM, *p*-Phenylendiamin 81 mM, EDTA 0.04 mM. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 11 mM Natriumazid. Die Inkubation erfolgte bei 25° in einem thermostatisierten Kuvetten-Halter während 30 sec bis 10 min bei hoher Enzym Konzentration und bei 37° im Wasserbad, während 15–30 min bei niedriger Enzym Konzentration (Serum). Eine Einheit wurde zunächst als die Zunahme der Extinktions-Differenz zwischen Analyse und Leerwert pro Minut um 0.01 (37°) definiert. Spätere Vergleichsuntersuchungen ergaben, dass 100 dieser Einheit 0.31 mg reinem Caeruloplasmin entsprechen. Die Umrechnung der Einheiten von 25°

auf  $37^\circ$  erfolgte mit Hilfe eines experimentell ermittelten  $Q_{10}$ -Wertes von 3.3 (Fig. 1).

Die Sedimentationsmessungen erfolgten mit der Phywe Ultrazentrifuge bei Zimmertemperatur ( $20^\circ$ ) und einer Rotor-Umdrehungs-Geschwindigkeit von 45000/min. Von beiden Fraktionen, C-C und C-D, (in 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6.8) wurden je 3–4 Bestimmungen bei verschiedenen Eiweiss-Konzentrationen durchgeführt. Die Auftragung von  $s$  gegen die Protein-Konzentration (Fig. 2) ergab eine Gerade, aus der durch Extrapolation  $s_0$  ermittelt wurde. Die übrigen Korrekturen erfolgten nach den Angaben von SVEDBERG UND PETERSON<sup>12</sup>.

Zur Aufnahme der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektren wurde ein Varian-Spektrometer von Typ V 4500 benützt. Die Feldmodulation betrug 100 kc. Als Kuvette diente ein Quarzröhrchen. Zur Untersuchung wurden 0.2 ml erschöpfend dialysiertes Caeruloplasmin verwendet.

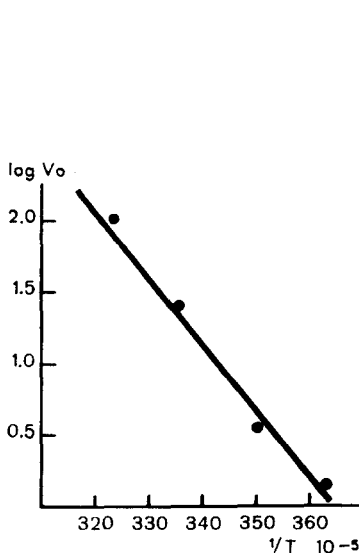


Fig. 1. Temperatur-Abhängigkeit der *p*-Phenyldiamin-Oxydation durch Caeruloplasmin.

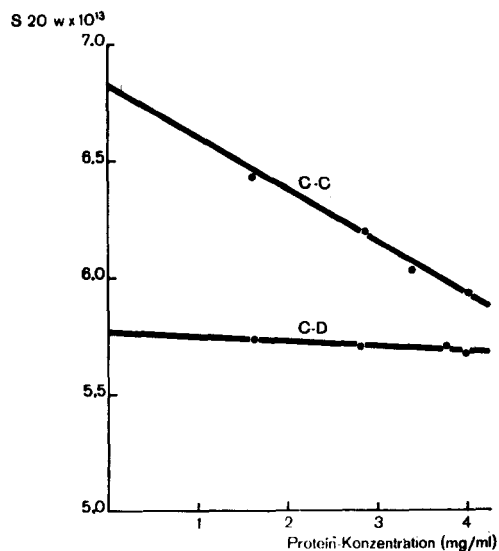


Fig. 2. Abhängigkeit von  $s_{20,w} \times 10^{13}$  von der Eiweiss-Konzentration (in 0.125 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6.8).

Die vertikale Stärkegel-Elektrophorese wurde nach der Methode von SMITHIES<sup>13</sup> durchgeführt. Als Trägermedium diente kommerzielle hydrolysierte Stärke\*. Bei pH 8.7 wurde ein 0.3 M Borat-Puffer<sup>13</sup>, bei pH 5.7 ein 0.01 M Acetat-Puffer<sup>4</sup> verwendet. Die Caeruloplasmin-Banden wurden durch Inkubation der halbierten Streifen während 4 h bei  $37^\circ$  im oben erwähnten Inkubationsgemisch kolorimetrisch dargestellt. Die Eiweiss-Färbung erfolgte mit Amidoschwarz.

Die Immun-Elektrophoresen wurden uns freundlicherweise von Dr. D. L. A. ROULET im Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes in Bern (Direktor P.D. Dr. A. HÄSSIG) nach einer Modifikation<sup>14</sup> der Mikromethode von SCHEIDEGGER<sup>15</sup> vorgenommen.

Die Säulen-Chromatographie auf DEAE-Cellulose erfolgte nach den Angaben

\* Bezugsquelle: Connaught Laboratories, University of Toronto, Toronto (Canada).

von SOBER *et al.*<sup>16</sup>. Eluiert wurde stufenweise mit 0.125 und 0.3 *M* Kaliumphosphat-Puffer pH 6.8. Zur Trennung von C-C und C-D durch Hydroxylapatit-Säulen-Chromatographie folgten wir genau den Vorschriften von BROMAN<sup>3</sup>. Der Hydroxylapatit wurde nach TISELIUS *et al.*<sup>17</sup> hergestellt. Die Eluierung erfolgte mit Hilfe eines linearen Kaliumphosphat-Gradienten (pH 6.8, 0.125–0.40 *M*).

Zur Konzentrierung der Fraktionen wurden diese dialysiert, auf Hydroxylapatit adsorbiert und mit 0.40 *M* Puffer frontal eluiert. Zur Entsalzung wurde zunächst dialysiert, doch erwies sich später die Gel-Filtration auf Sephadex G-25\* als rascheres und schonenderes Verfahren<sup>18</sup>.

#### Fraktionierungs-Schema

Rest-Fraktion B ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline) (2000  $\times$  g). Mit 2000 ml 0.16 *M* NaCl-Lösung homogenisieren (Turmix). pH auf 6.8 einstellen. 1 Woche bei 4° stehen lassen. Abzentrifugieren.

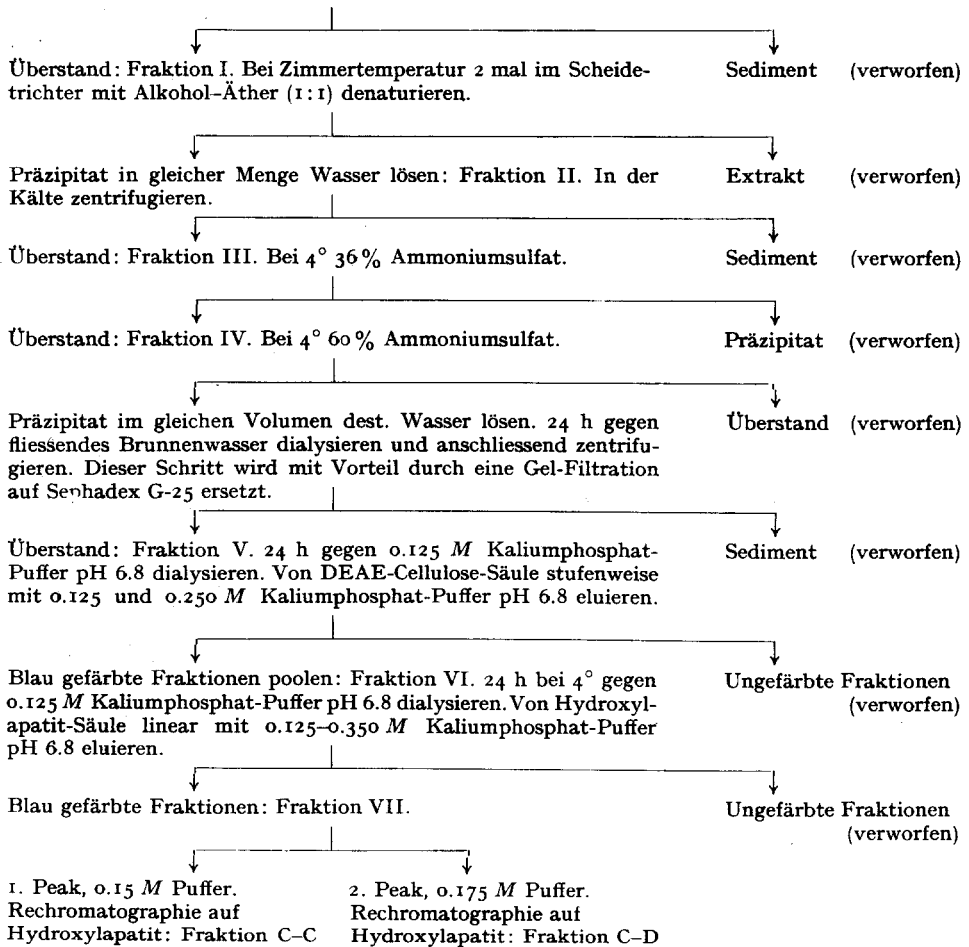


Fig. 3. Fraktionierungs-Schema für die Isolierung von C-C und C-D.

\* Bezugsquelle: Pharmacia, Uppsala (Schweden).

## RESULTATE

*Isolierung von C-C und C-D*

Das entwickelte Isolierungs-Schema ist in Fig. 3 dargestellt. Das Ausgangsmaterial (Rest-Fraktion B der von NITSCHMANN, KISTLER UND LERGIER<sup>19</sup>, modifizierten Plasma-Fraktionierungs-Methode 10 nach COHN *et al.*<sup>20</sup>) wird mit Natriumchlorid extrahiert und der Extrakt mit Alkohol-Äther denaturiert. Bei der anschliessenden Ammoniumsulfat-Fraktionierung fällt die Caeruloplasmin-haltige Fraktion bei 36–60% Sättigung aus. Ein Teil der Verunreinigungen präzipitieren während der anschliessenden Dialyse gegen fliessendes Brunnenwasser und werden abzentrifugiert. Dieser Schritt wird mit Vorteil durch eine Gel-Filtration auf Sephadex G-25 ersetzt. Die Lösung wird dann gegen 0.125 M Puffer äquilibriert und auf eine DEAE-Cellulose-Säule gegeben. Nach Eluierung mit 0.125 und 0.300 M Puffer werden die blauen Fraktionen zusammengeschüttet und auf Hydroxylapatit nach der Vorschrift von BROMAN<sup>3</sup> in die Komponenten C-C und C-D getrennt. Die Eluierung kann sowohl stufenweise wie auch mit Hilfe eines Gradienten erfolgen. Eine typische stufenweise Eluierung ist in Fig. 4 dargestellt. Fraktion C-C erscheint homogen, Fraktion C-D umfasst häufig mehrere Komponenten, von denen C-D<sub>0</sub> und C-D<sub>1</sub> in Fig. 4 zu erkennen sind. Die beiden Cupro-Enzyme werden zum Schluss getrennt nochmals auf Hydroxylapatit rechromatographiert. Die im folgenden angeführten analytischen Daten beziehen sich auf die rechromatographierten Rein-Fraktionen. Wie aus Tabelle I hervorgeht, beträgt die Ausbeute um 20%, die Reinheit von C-C und C-D über 95%.

*Physikalische und chemische Eigenschaften von C-C und C-D*

Die Charakteristiken der Iso-Enzyme C-C und C-D sind in Tabelle II zusammengestellt. Bei allen Bestimmungen handelt es sich um Mittelwerte von mindestens 3 Doppel-Analysen an zu verschiedenen Zeiten hergestellten Reifraktionen. Da die reinen Caeruloplasmine sehr labil sind, wurde Wert darauf gelegt, die Bestimmungen möglichst rasch nach der Isolierung durchzuführen. Als Basis für die Eiweiss-Werte galten die Resultate mit der Kjeldahl-Methode. Vergleichs-Bestimmungen mit der Lowry-Modifikation ergaben eine konstante Übereinstimmung, doch zeigte sich, dass

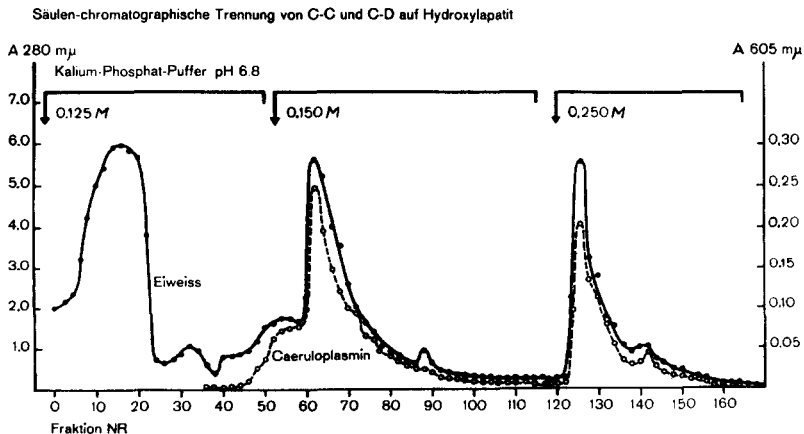


Fig. 4. Säulen-Chromatographie von Fraktion V auf DEAE-Cellulose. Eluierung mit Kalium-Phosphat-Puffer pH 6.8. Bestimmung von Eiweiss und Caeruloplasmin.

die Farb-Intensität des Caeruloplasmins um einen Faktor von 1.4 höher liegt als diejenige des Serum-Albumin-Standardes. Die Extinktions-Koeffizienten lagen für C-C um 17.6, für C-D um 15.7; also etwas höher als die in der Literatur angeführten Werte<sup>5,21</sup>. Die Kupfer-Konzentration—bezogen auf Eiweiss—war für C-C und C-D gleich und betrug um 0.33% (siehe Ref. 1, 5). Die Extinktions-Koeffizienten bei 605 m $\mu$  lagen bei unseren Präparaten konstant tiefer als diejenigen von LAURELL UND HOLMBERG<sup>1</sup> und DEUTSCH<sup>21</sup> und zwar um 0.55 im Gegensatz zu 0.64 (siehe Ref. 1) und 0.68 (siehe Ref. 21). Die höheren Extinktionen bei 280 m $\mu$  und die tieferen Werte bei 605 m $\mu$  haben zur Folge, dass der bei der Isolierung des Caeruloplasmins häufig zur Messung der spezifischen Konzentration verwendete Wert  $E_{605\text{ m}\mu}/E_{280\text{ m}\mu}$  ebenfalls tiefer liegt und zwar um 0.033 statt 0.044 (siehe Ref. 5) oder 0.047 (siehe Ref. 21).

TABELLE I  
AUSBEUTE BEI DER ISOLIERUNG VON C-C UND C-D

Fraktion		Eiweiss		Caeruloplasmin		Reinheit (%)	Ausbeute (%)
Nr.	ml	mg/ml	mg total	mg/ml	mg total		
Serum		80		0.39		0.0049	
I	4000	143	572 000	0.0081	4650	0.81	100
II		190		0.0106		1.06	
III	1480	89	13 200	0.023	2950	2.25	63
IV		24		0.068		6.8	
V	302	21.7	6 550	0.21	1390	21.3	30
VI	250	6.21	1 560	0.68	1050	67.5	23
VII C-C	220	3.1	682	0.97	705	97	} 20
C-D	60	4.0	240	0.95	252	95	

TABELLE II  
CHEMISCHE, PHYSIKALISCHE- UND BIOLOGISCHE DATEN

	Gemisch (Literatur-Angaben)	C-C	C-D
<i>Chemische Charakteristiken</i>			
Cu/N, %	1.97 (s. Ref. 1); 2.00 (s. Ref. 5); 1.80 (s. Ref. 21)	2.10	1.80
Cu/Protein, %	0.32 (s. Ref. 1); 0.31 (s. Ref. 5)	0.34	0.32
$E_{280\text{ m}\mu}$ 1%, 1 cm	14.6 (s. Ref. 21)	17.6	15.7
$E_{605\text{ m}\mu}$ 1%, 1 cm	0.64 (s. Ref. 1); 0.68 (s. Ref. 21)	0.56	0.54
Hexose/Protein (%)	2-3 (s. Ref. 37-41)	7.0	3.2
K <sub>mp-PD</sub> (Protein)	$2.5 \cdot 10^{-3}$ (s. Ref. 1)	$5.9 \cdot 10^{-4}$	$4.2 \cdot 10^{-4}$
K <sub>mp-PD</sub> (Kupfer)		$5.9 \cdot 10^{-4}$	$5.9 \cdot 10^{-4}$
<i>Physikalische Daten</i>			
$s_{20,w}^0$	7.2 (s. Ref. 1); 7.1 (s. Ref. 21); 7.6 (s. Ref. 22)	6.82	5.77
$D_{20,w}$ (cm <sup>2</sup> sec <sup>-1</sup> )	$4.4 \cdot 10^{-7}$ (s. Ref. 22)		
Mol. gew.	151 000 (s. Ref. 1); 150 000 (s. Ref. 21)	148 000	125 000
Cu-Atome/Mol	7.5 (s. Ref. 1); 8.0 (s. Ref. 21)	7.95	6.30
<i>Biologische Variabilität<sup>18,7</sup></i>			
<i>mg/100 ml Plasma (Mensch), enzymatisch bestimmt</i>			
Erwachsene	35 $\pm$ 11	31 $\pm$ 6	8 $\pm$ 2
Gravide	84 $\pm$ 32	74	22
Neugeborene	10 $\pm$ 7	5	10

Zur Abklärung der enzymatischen Spezifität der Iso-Enzyme wurde der  $K_m$  gegenüber *p*-Phenylendiamin, Dimethyl-*p*-Phenylendiamin und Tetramethyl-*p*-Phenylendiamin bestimmt. Eine typische Analyse ist in Fig. 5 dargestellt. Das Dimethyl- und Tetramethyl-Derivat geben etwas niedrigere  $K_m$  Werte. Die Bestimmung dieser Konstanten ergab die ersten Anhaltspunkte für eine Heterogenität von C-C und C-D. Wurde der Eiweiss-Gehalt als Bezugs-Basis verwendet, so war der  $K_m$  für C-C und C-D identisch. Bezogen auf den Kupfer-Gehalt ergab sich jedoch ein leicht niedrigerer Wert für C-D als für C-C.

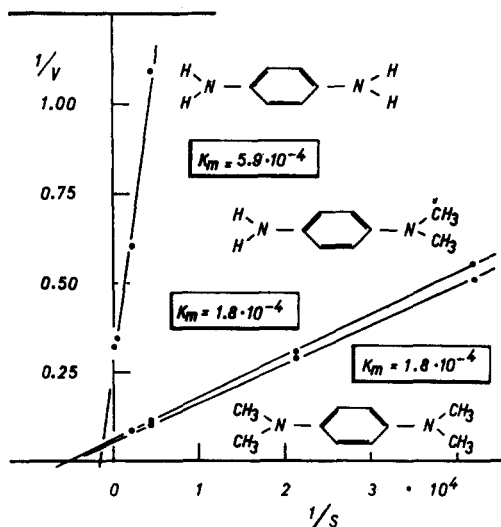


Fig. 5. Bestimmung des  $K_m$  gegenüber *p*-Phenylendiamin, Dimethyl-*p*-Phenylendiamin und Tetramethyl-*p*-Phenylendiamin (C-C).

Die Bestimmung der Sedimentationskonstante (Fig. 6) ergab Werte um 6.8 für C-C und 5.8 für C-D. Der Wert für C-D liegt etwas tiefer als die entsprechenden Angaben anderer Autoren<sup>1, 21, 22</sup>. Unter der Annahme desselben Diffusions-Koeffizienten  $D_{20,w}$  von  $4.5 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/sec<sup>22</sup> für beide Iso-Enzyme errechnet sich für C-C ein Molekulargewicht von 148000 und für C-D ein solches von 125000. C-C enthält somit entsprechend den frühen Angaben von LAURELL UND HOLMBERG<sup>1</sup> 8 Atome

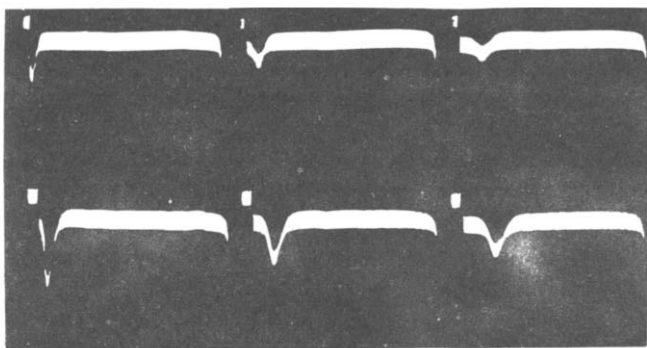


Fig. 6. Sedimentation von C-C(a) und C-D(b) in der Phywe-Ultrazentrifuge.

Kupfer pro Molekül<sup>5,21</sup>, C-D jedoch nur 6 Atome Kupfer pro Molekül. Der Unterschied zwischen C-C und C-D bezieht sich jedoch nicht nur auf den Kupfer-Gehalt. Bestimmungen der Gesamt-Kohlehydrate ergaben 7% Hexosen in C-C bei nur 3.2% Hexosen in C-D. C-D ist ein deutlich Kohlehydrat-ärmeres Glykoprotein als C-C.

Bei der Stärkegel-Elektrophorese können wir die Angaben von SCHEINBERG UND MORELL<sup>4</sup> nur bestätigen. Bei pH 8.7 wandern beide Caeruloplasmine gleich, bei pH 5.5 wandert C-D deutlich weniger stark anodisch als C-C. Die immun-elektrophoretischen Analysen sind in Fig. 7 zusammengestellt. Sowohl bei C-C als auch C-D sind 2 Präzipitatlinien nachweisbar. Die Verunreinigung in C-C entspricht Spuren von Albumin,

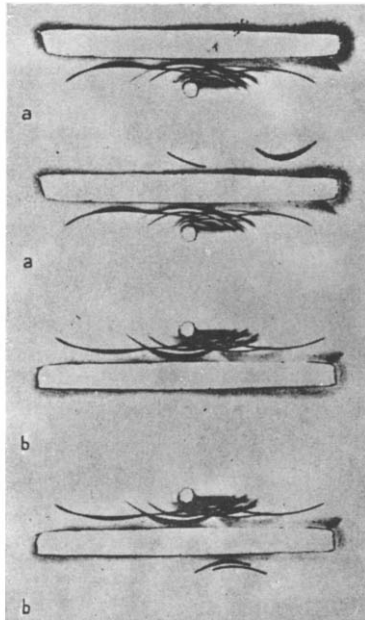


Fig. 7. Immun-elektrophoretische Analyse von C-C (a) und C-D (b).

die trotz wiederholter Chromatographie nicht ganz zu entfernen waren. C-D wandert rascher anodisch als C-C. Die beiden Iso-Enzyme sind somit immun-elektrophoretisch different. Die Verunreinigung von C-D konnte nicht identifiziert werden, entspricht aber wahrscheinlich der Fraktion C-D<sub>1</sub> von MORELL UND SCHEINBERG<sup>4</sup>.

Da die Wertigkeit des Kupfers beim Caeruloplasmin noch immer zur Diskussion steht wurde mit der Durchführung von Elektronen-Spin-Resonanz-Untersuchungen begonnen. Zweiwertiges Kupfer ist paramagnetisch und kann daher mit dieser Methode eindeutig nachgewiesen werden. Fig. 8 zeigt das typische Cu<sup>2+</sup> Signal eines tiefgefrorenen Caeruloplasmin-Präparates. Nach ultravioletter Bestrahlung, die zu einer Inaktivierung der Oxydase-Aktivität führt<sup>23,24</sup> erscheint neben dem Cu<sup>2+</sup> Signal noch ein weiteres, das auf die Entstehung eines freien Radikales hinweist. Dieses zweite Signal verschwindet nach der Auftauung, während das Cu<sup>2+</sup> Signal erhalten bleibt.

Schliesslich ist noch zu erwähnen, dass die Stabilität der Reinenzyme schlecht ist. Lyophilisierte oder eingefrorene Präparate zeigen nach 2 Wochen einen ca.



10%igen Aktivitäts-Verlust. C-D ist noch schlechter haltbar als C-C, doch fehlen bisher systematische Untersuchungen. Eine Inaktivierung durch Gefrieren ist auch von anderen Cupro-Proteinen wie dem Hämocyanin<sup>25</sup> und der Ascorbat-Oxydase<sup>26</sup> bekannt.

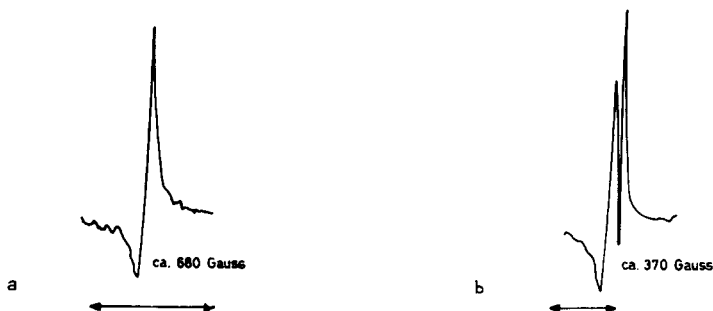


Fig. 8. Elektronen-Spin-Resonanz-Spektrum von gefrorenem C-C. Temperatur  $-20^{\circ}$ . (a) vor und (b) nach ultraviolette Bestrahlung während 9 min.

#### DISKUSSION

Während der letzten Jahre wurde bei mehreren Enzymen das Vorkommen verschiedener molekularer Spezies beobachtet. Mit Ausnahme der Phosphorylase<sup>27</sup>, bei der es sich wahrscheinlich um Polymere handelt, ist die Ursache dieser Heterogenität nicht klar. Indirekte Hinweise lassen bei der Lactat-Dehydrogenase vermuten, dass die einzelnen Iso-Enzyme sich in ihrer Primär-Struktur unterscheiden<sup>28, 29</sup>. Die ersten Hinweise auf das Vorkommen mehrerer Caeruloplasmine verdanken wir BROMAN<sup>3</sup>, der auf Hydroxylapatit-Säulen zwei Komponenten trennen konnte. SCHEINBERG UND MORELL<sup>4</sup> fanden später auch ein elektrophoretisch differentes Verhalten der Iso-Enzyme C-C und C-D und beobachteten weiterhin, dass C-D nicht homogen ist. Diese neueren Beobachtungen machen mehrere ältere Befunde verständlich. Bereits SVEDBERG<sup>2</sup> fand bei einem reinen Caeruloplasmin mehrere Komponenten in der Tiselius-Elektrophorese. MORELL UND SCHEINBERG<sup>30</sup> gelang es, ein isoliertes Apoenzym mit Kupfer zu restituieren, doch unterschied sich das restituierte Enzym besonders im Kupfer-Gehalt und der Enzym-Aktivität wesentlich vom nativen Caeruloplasmin (Tabelle II). DEUTSCH<sup>21</sup> beobachtete in der Elektrophorese mehrere Komponenten. Obschon präparative Artefakte bei der Reinigung des Caeruloplasmins leicht auftreten, schienen eigene Beobachtungen<sup>6, 7</sup> über die physiologische Variabilität von C-C und C-D darauf hinzuweisen, dass es sich bei C-C und C-D um chemische Individuen mit biologischer Bedeutung handelt. Es schien daher angezeigt, zunächst eine Reinigung der beiden Iso-Enzyme zu versuchen. Als Ausgangsmaterial wurden bisher verwendet: Plasma<sup>4</sup>, altes Blutbank-Serum<sup>21</sup>, Schwangeren-Serum<sup>1-3, 21</sup>, die Fraktion IV nach COHN<sup>19, 20</sup> und die Fraktion G2 nach KECKWICK UND MACKAY<sup>5, 33</sup>. Wir isolierten unsere Enzyme aus der Rest-Fraktion B der von NITSCHMANN, KISTLER UND LERGIER<sup>19</sup> entwickelten Modifikation der Cohn-Methode 10 (siehe Ref. 20), die vorwiegend  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline enthält. Wie die meisten anderen Autoren führten auch wir eine Ammoniumsulfat-Fällung durch<sup>1, 2, 21, 32, 34</sup>. Chromatographie auf DEAE-Cellulose<sup>5, 21, 22, 31, 35</sup> ist für die Vorreinigung geeignet, erlaubt jedoch selten eine scharfe Trennung von C-C und C-D. Isolierungsverfahren, wie etwa diejenigen von DEUTSCH<sup>21</sup> und SANDERS<sup>22</sup>, die mit der Chromatographie auf DEAE-Cellulose

abschliessen, erhalten Gemische der beiden Iso-Enzyme. Eine gute Trennung von C-C und C-D gelingt nach unserer Erfahrung nur durch Chromatographie auf Hydroxylapatit.

Unsere analytischen Daten in bezug auf C-C stimmen weitgehend mit denjenigen früherer Autoren, die mit einem Gemisch der beiden Iso-Enzyme arbeiteten, überein. Dies ist zu erwarten, da C-C um 75 % des gesamten Caeruloplasmins ausmacht und stabiler als C-D ist. Überraschend hoch war der Hexosen-Gehalt von C-C, der um 7 % lag und somit das Caeruloplasmin in die Reihe der Glykoproteine einreicht. HUMOLLER *et al.*<sup>26</sup> fanden einen Sialinsäure-Gehalt von 6 %. Nach den Angaben von SCHULTZE<sup>37-42</sup> soll das Caeruloplasmin nur 2-3 % Hexosen enthalten. C-D besitzt ein Molekulargewicht, das etwa 23000 geringer ist als dasjenige von C-C. Es handelt sich also sicher um eine andere molekulare Spezies. Weitere Unterschiede zwischen den Iso-Enzymen liessen sich mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese und der Immun-Elektrophorese nachweisen. Es scheint uns wahrscheinlich, dass nicht Unterschiede in der Zahl der freien Histidengruppen<sup>4</sup> für diese Differenzen verantwortlich sind, sondern der unterschiedliche Gehalt an Kohlehydraten (Sialinsäure). C-D enthält nämlich nur etwa 3.2 % Hexosen, eine Zahl, die SCHULTZE<sup>37-41</sup> für sein Caeruloplasmin-Gemisch fand. Die Verwendung von C-D als Antigen würde erklären, weshalb SCHULTZE im Gegensatz zu allen anderen Beobachtern<sup>7, 41</sup> beim Neugeborenen, der überwiegend C-D besitzt<sup>6, 7</sup>, höhere Caeruloplasmin-Werte fand als beim Erwachsenen, bei dem C-C überwiegt<sup>6, 7</sup> (Tabelle II).

Unsere Daten zeigen, dass C-C und C-D keine Polymere sind, wie dies von der Phosphorylase und den Makroglobulinen her bekannt ist, sondern differente molekulare Spezies, eventuell mit gemeinsamem Anteil (C-D). Die unterscheidene Komponente [(C-C) — (C-D)] entspricht einem Glykoprotein mit einem Molekulargewicht um 23000, zwei Kupferatomen und einem hohen Kohlehydratanteil (28 %). Diese Komponente weist Ähnlichkeiten mit dem von CARTWRIGHT<sup>43, 44</sup> isolierten Erythrocytuprein auf, das ein Molekulargewicht von 33000 besitzt, 2 Kupferatome enthält und nahezu farblos ist.

Die Caeruloplasmine sind sehr labile Glykoproteine und es treten daher bei der Präparation leicht Artefakte auf, die sich vor allem in einem differenten Kupfergehalt und einer unterschiedlichen enzymatischen Aktivität unterscheiden. Einige solche Präparate wurden in Tabelle III zusammengestellt. Das aus Coenzym und Apoenzym restituierte Holoenzym von MORELL UND SCHEINBERG<sup>30</sup> dürfte unter der Annahme eines Molekulargewichtes von 125000 noch 4 Kupferatome enthalten, ebenso das von

TABELLE III  
KUPFER-GEHALT UND OXYDASE-AKTIVITÄT VERSCHIEDENER CUPRO-PROTEINE

Literatur	Caeruloplasmine		Apoenzym + Cu <sup>2+</sup>	EDTA- behandelt	(C-C)-(C-D)	Erythro- cuprein
	C-C	C-D				
			30	36		43, 44
Cu/Eiweiss, %	0.34	0.32	0.18	0.20		
Oxydase-Aktivität, %	100	100	86	50		
Cu, % von C-C	100	94	60	60		
Molekulargewicht	148 000	125 000	?	?	23 000	33 000
Cu-Atome/Molekül	8	6	4 *	4 *	2	2

\* Unter Annahme eines Molekulargewichtes von 125000.

HUMOLLER *et al.*<sup>36</sup> durch Behandlung mit EDTA und Dialyse gegen kupferfreies Wasser erhaltene Produkt. Keines dieser beiden Präparate ist jedoch mit C-D identisch. Es scheint vor allem wichtig, die Kohlehydrat-Komponenten der einzelnen Moleküle näher abzuklären.

Die physiologische Bedeutung des Caeruloplasmins ist unklar. Eine intrazelluläre katalytische Funktion ist in Anbetracht der äusserst geringen Konzentration in der Leber unwahrscheinlich. Da die Leber radioaktives Kupfer rasch in Caeruloplasmin einbaut, wird meist eine Transportfunktion dieses Eiweisses angenommen. Da das Kupfer durch die Galle ausgeschieden wird und die Galle Caeruloplasmin enthält, scheint uns wahrscheinlich, dass das Caeruloplasmin als Träger für die Galle-Eliminierung des Kupfers eine Rolle spielt. Der hohe Kohlehydratanteil mit seiner stabilisierenden und vor allem Löslichkeits-verbessernden Wirkung wäre in diesem Falle besser verständlich. Bei der hepato-lentikulären Degeneration würde es sich nach dieser Hypothese um eine Störung der Kupfer-Ausscheidung durch die Galle als Folge eines Defektes in der Trägermolekül-Synthese handeln.

Über die Beziehung zwischen C-C und C-D kann zur Zeit noch wenig ausgesagt werden. Physiologische Beobachtungen, besonders das parallele Verhalten der beiden Iso-Enzyme<sup>6,7</sup> sprechen dafür, dass C-D einer Vorstufe oder einem Degradationsprodukt von C-C entspricht, wie wir das bereits früher vermuteten<sup>6,7</sup>. Die Beobachtung, dass beim Neugeborenen C-D überwiegt, unterstützt eher die Auffassung eines Precursor-Moleküles.

Diese Arbeit wurde mit der Unterstützung des "Schweizerischen Nationalfond zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung" (Nr. 1968) durchgeführt. Wir danken Herrn Dr. H. WEAVER (Varian Research Laboratories, Zürich) für seine Hilfe bei der Aufnahme der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektren und Herrn Dr. D. L. A. ROULET vom Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes in Bern (Direktor P.D. Dr. A. HÄSSIG) für die immun-elektrophoretischen Analysen, und Herrn H. JOSS UND Fr. E. M. WERREN für die technische Assistenz.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Caeruloplasmin kommt in Human-Plasma in mehreren molekularen Spezies vor, von denen quantitativ C-C (ca. 70%) und C-D (ca. 25%) überwiegen. Physiologische Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die Heterogenität biologisch ist und nicht auf präparativen Artefakten beruht. Zur weiteren Abklärung der funktionellen Bedeutung dieser Cupro-Proteine wurden C-C und C-D aus Human-Serum isoliert.

2. Als Ausgangsmaterial diente die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulinhaltige Restfraktion B der Plasma-Fraktionierung nach NITSCHMANN, KISTLER UND LERGIER. Das Gemisch der beiden Iso-Enzyme wurde durch Extraktion, Alkohol-Äther Denaturierung, Ammoniumsulfat-Fällung und Säulen-Chromatographie auf DEAE-Cellulose isoliert. Die Trennung von C-C und C-D erfolgte durch Säulen-Chromatographie auf Hydroxylapatit.

3. Die Ausbeute betrug 20%, die Reinheit von C-C und C-D zwischen 95 und 100%. Die Konzentrierung erfolgte ausgehend vom Human-Plasma auf das 240fache.

4. Die beiden Iso-Enzyme unterscheiden sich im Molekulargewicht (C-C: 148000; C-D: 125000), im Kupfergehalt/Molekül (C-C: 8; C-D: 6) und im Hexosen-Gehalt

(C-C 7%; C-D 3.2%). Sie verhalten sich verschieden bei Stärkegel-Elektrophorese (pH 5.7) und bei der Immun-Elektrophorese.

5. C-D unterscheidet sich von C-C durch das Fehlen einer Kohlehydrat-reichen (28%), kupferhaltigen (2 Atome/Molekül) Komponente, die ein Molekulargewicht von ca. 23000 besitzt. Es ist wahrscheinlich, dass C-D entweder einen Precursor oder ein Degradationsprodukt von C-C darstellt.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> C. G. HOLMBERG UND C. B. LAURELL, *Acta Chem. Scand.*, 2 (1948) 550.
- <sup>2</sup> C. G. HOLMBERG UND C. B. LAURELL, *Acta Chem. Scand.*, 5 (1951) 476.
- <sup>3</sup> L. BROMAN, *Nature*, 182 (1958) 1655.
- <sup>4</sup> A. G. MORELL UND I. H. SCHEINBERG, *Science*, 131 (1960) 930.
- <sup>5</sup> G. CURZON UND L. VALLET, *Biochem. J.*, 74 (1960) 279.
- <sup>6</sup> R. RICHTERICH, E. GAUTIER, H. STILLHART UND E. ROSSI, *Helv. Paediat. Acta*, 15 (1960) 424.
- <sup>7</sup> R. RICHTERICH, E. GAUTIER, H. STILLHART UND E. ROSSI, *Symposium on Wilson's Disease*, 20-22. Sept. 1960, Oxford University Press, London, im Druck (vgl. *Lancet* (1960) 1294).
- <sup>8</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR UND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- <sup>9</sup> G. R. STARK UND R. C. DAWSON, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 191.
- <sup>10</sup> C. J. GUBLER, M. E. LAHEY, H. ASHENBRUCKER, G. E. CARTWRIGHT UND M. M. WINTROBE, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 209.
- <sup>11</sup> D. L. MORRIS, *Science*, 107 (1948) 254.
- <sup>12</sup> T. SVEDBERG UND K. O. PETERSON, *The Ultracentrifuge*, Oxford University Press, New York, N.Y., 1940.
- <sup>13</sup> O. SMITHIES, *Biochem. J.*, 71 (1959) 585.
- <sup>14</sup> E. GUGLER UND G. VON MURALT, *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 89 (1959) 925.
- <sup>15</sup> J. J. SCHEIDEGGER, *Internat. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7 (1955) 103.
- <sup>16</sup> E. A. PETERSON UND H. A. SOBER, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 751.
- <sup>17</sup> A. TISELIUS, S. HIERTÉN UND O. LEVIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 132.
- <sup>18</sup> J. PORATH UND P. FLODIN, *Nature*, 183 (1959) 1657.
- <sup>19</sup> H. NITSCHMANN, P. KISTLER UND W. E. LERGIER, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 866.
- <sup>20</sup> E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, D. J. MULFORD, J. N. ASGWORTH, M. MELIN UND H. L. TAYLOR, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (1946) 459.
- <sup>21</sup> H. F. DEUTSCH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 89 (1960) 225.
- <sup>22</sup> B. E. SANDERS, O. P. MILLER UND M. N. RICHARDS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 84 (1959) 60.
- <sup>23</sup> M. H. APRISON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 78 (1958) 260.
- <sup>24</sup> M. H. APRISON UND K. M. HANSON, *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, 100 (1959) 643.
- <sup>25</sup> M. LITT UND W. C. BOYD, *Nature*, 181 (1958) 1075.
- <sup>26</sup> E. FRIEDEN UND I. MAGGIOLI, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1952) 42.
- <sup>27</sup> N. B. MADSEN UND F. R. N. GURD, *J. Biol. Chem.*, 223 (1956) 1075.
- <sup>28</sup> T. WIELAND, G. PFLEIDERER UND K. RAJEWSKI, *Z. Naturforsch.*, 15b (1960) 434.
- <sup>29</sup> R. RICHTERICH, K. ZUPPINGER UND E. ROSSI, *Schweiz. Med. Wochenschr.*, im Druck.
- <sup>30</sup> A. G. MORELL UND I. H. SCHEINBERG, *Science*, 127 (1958) 588.
- <sup>31</sup> C. B. LAURELL, in F. W. PUTNAM, *The Plasma Proteins*, Vol. 1, Academic Press, New York und London, 1960, p. 360.
- <sup>32</sup> I. H. SCHEINBERG UND A. G. MORELL, *J. Clin. Invest.*, 36 (1957) 1193.
- <sup>33</sup> R. A. KEKWICK UND M. E. MACKAY, *Spec. Rep. Ser. Med. Research Council*, London Nr. 286, 1954.
- <sup>34</sup> S. OSAKI, *J. Biochem.*, 48 (1960) 190.
- <sup>35</sup> M. STEINBUCH UND M. QUENTIN, *Nature*, 183 (1959) 323.
- <sup>36</sup> F. L. HUMOLLER, *J. Lab. Clin. Med.*, 56 (1960) 222.
- <sup>37</sup> H. E. SCHULTZE, I. GÖLLNER, K. HEIDE, M. SCHÖNENBERGER UND G. SCHWIGK, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 463.
- <sup>38</sup> H. E. SCHULTZE UND G. SCHWIGK, *Behring-Werk Mitteilungen*, 33 (1957) 11.
- <sup>39</sup> H. E. SCHULTZE, *J. Lab. Clin. Invest., Suppl.* 31, 10 (1957) 135.
- <sup>40</sup> H. E. SCHULTZE, *Deut. Med. Wochenschr.*, 83 (1958) 1742.
- <sup>41</sup> H. E. SCHULTZE UND G. SCHWIGK, *Clin. Chim. Acta*, 4 (1959) 15.
- <sup>42</sup> W. HITZIG, *Habilitations-Schrift*, Zürich, 1960.
- <sup>43</sup> J. R. KIMMEL, H. MARKOWITZ UND N. M. BROWN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 46.
- <sup>44</sup> H. MARKOWITZ, G. E. CARTWRIGHT UND M. M. WINTROBE, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 40.