



Saure Phosphatasen

Pathophysiologie

Unter dem Begriff saure Phosphatasen (EC 3.1.3.2) wird eine molekulargenetisch heterogene Gruppe von Enzymen zusammengefasst, die o-Phosphorsäuremonoester mit unterschiedlicher Effizienz in Phosphat und freien Alkohol oder Phenol hydrolysieren. Ihr Aktivitätsmaximum liegt im sauren Bereich (pH 4 bis 6), sie zeigen unterschiedliche Substrataffinitäten (z. B. gegenüber 4-Nitrophenylphosphat, α -Naphthylphosphat, Thymolphthaleinphosphat) bei fehlender Substratspezifität. Enzym-spezifische Substrate sind nicht bekannt. Die Enzyme sind gegenüber verschiedenen Inhibitoren (z. B. L⁺-Tartrat, Fluorid) unterschiedlich sensibel wobei der Grad der Inhibition auch von dem eingesetzten Substrat abhängt.

Abgesehen von ihrer gemeinsamen funktionellen Phosphataseaktivität unterscheiden sich diese sog. Isoenzyme der sauren Phosphatase (sP) hinsichtlich Gewebeherkunft, Molekulargenetik (Genort, Genstruktur), Proteineigenschaften und Resistenz gegenüber Inhibitoren erheblich (siehe Tabelle 1). Die vier wichtigsten sauren Phosphatasen des Menschen sind

- ▶ saure Erythrozyten-Phosphatase (EsP)
- ▶ saure Prostataphosphatase (PsP)
- ▶ ubiquitäre saure Lysosomen-Phosphatase (LsP)
- ▶ saure tartratresistente Phosphatase der Makrophagen/Osteoklasten (TRAP)

Tabelle 1

Saure Phosphatase	Herkunft	M _r [kDa]	Bande	Chromosom	aa	T _R
Erythrozyten sP	Erythrozyten, auch andere Zellen	18,00	n. n.	2p25	157	+
Prostata sP	Prostata, Gehirn, Milz, Leber, Thrombozyten	44,57	2	3q21 - q23	345	-
Lysosomale sP	Ubiquitär	48,32	3	11p11.2 - p11.11	423	-
Makrophagen sP	Makrophagen Gaucherzellen (Milz)	36,36	5a	19p13.3 - 13.2	325 *	+
Osteoklasten sP	Osteoklasten	36,36	5b	19p13.3 - 13.2	325 *	+

Bande elektrophoretische Mobilität zur Kathode in sauren Polyacrylamidgelen, die Banden mit der höchsten Zahl wandern am schnellsten, besitzen somit die höchste Basizität.

M_r relative Molekülmasse

aa Aminosäure

T_R Tartratresistenz

n. n. nicht nachweisbar. Die saure Erythrozyten-Phosphatase lässt sich mit dieser Technik nicht nachweisen.

* TRAP 5a und TRAP 5b sind molekulargenetisch identisch, sie unterscheiden sich nur in der Glykosylierung.

Diese Enzyme und ihre jeweiligen Isoenzyme werden normalerweise nur in niederen Konzentrationen im Plasma angetroffen; sie können jedoch bei verschiedenen Erkrankungen vermehrt gebildet werden und dann als serologische und histochemische Krankheitsmarker dienen.



Saure Phosphatasen

Die sauren Phosphatasen wandern in sauren Polyacrylamidgelen mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität kathodenwärts. Die hierbei erhaltenen Proteinbanden (je nach Testverfahren 5 - 7 Banden) wurden folgenden Phosphatasen zugeordnet:

- ▶ Bande 0 (keine Mobilität), einer sauren Phosphatase aus Asziteszellen mit Autophagenaktivität
- ▶ Bande 1 einer membrangebundenen mikrosomalen sauren Phosphatase,
- ▶ Bande 2 und 4, zwei immunologisch identischen sauren Prostataphosphatasen,
- ▶ Bande 3 der ubiquitären lysosomalen sauren Phosphatase
- ▶ Bande 5 der tartratresistenten sauren Phosphatase aus Makrophagen/Osteoklasten, Haarzellen und Gaucherzellen (TRAP 5).

Die saure Phosphatase der Erythrozyten lässt sich in dieser Technik nicht darstellen. Sie ist ein anionisches Protein, das schlecht mit dem bei diesen Untersuchungen verwendeten Substrat α -Naphthylphosphat reagiert. Bei modifizierten Techniken fanden sich auch andere Bandenzuordnungen, für die saure lysosomale Phosphatase (Bande 3), die Prostataphosphatase (Bande 2) und die Makrophagen/Osteoklasten-Phosphatase (Bande 5) bleibt die Zuordnung jedoch erhalten.

EsP

Die saure Erythrozyten-Phosphatase (EsP; EC 3.1.3.2, EC 3.1.48) ist ein polymorphes Enzym mit drei Allelen (A, B, C) aus denen sich sechs mögliche Genotypen des Enzyms ergeben. Homozygote besitzen die Genotypen AA, BB oder CC, Heterozygote die Genotypen AB, AC oder BC. Die Enzyme werden von einem Strukturgenlokus (ACP1-Lokus) auf Chromosom 2p25 kodiert. Die A-Allele unterscheiden sich von den B- und C-Allelen durch einen Aminosäureaustausch Q \rightarrow R in Position 105. Im A-Allel findet sich an dieser Stelle ein basischer Argininrest, in den B- und C-Allelen ein neutraler Glutaminrest. Daher besitzt das A-Allel einen höheren isoelektrischen Punkt, kann vermehrt saure Citrationen anlagern, welche die positive Ladung des Arginins kompensieren und dem Allel A eine schnellere Mobilität gegenüber den Allelen B und C verleihen. Was die kodierende Sequenz der mRNA betrifft, sind die Allele B und C identisch. Ein Unterschied findet sich nur bei der Proteinexpression, d. h. die genetischen Variationen müssen außerhalb der Kodierungssequenz für das Protein liegen.

Jede der homozygoten Allelformen lässt sich elektrophoretisch in eine schnell (fast, f) und eine langsam (slow, s) wandernde Isoform auftrennen (Afs; Bfs; Cfs). Die Sequenzen der nicht glykosylierten Isoenzyme Bf und Bs enthalten jeweils 157 Aminosäuren (aa); sie sind jedoch in der Erkennungssequenz (aa 40 - 73) nur zu 41 % homolog. Ein Histidinrest in Position 69 des Bs-Isoenzyms soll für dessen geringere anodische Mobilität verantwortlich sein. Auch die s- und f-Formen der A- und C-Allele sind nicht glykosyliert und bestehen aus 157 Aminosäurenresten. Sie differieren ebenfalls in der Erkennungssequenz (aa 40 - 73). Die Sequenz der Cf- und Cs-Isoenzyme ist mit der Sequenz der Bf- und Bs-Isoenzyme identisch, d. h. die Allele ACP1B und ACP1C kodieren gleiche Isoenzyme, die durch alternatives Spleißen der prä-mRNA entstehen. Die elektrophoretisch nachweisbare Differenz auf Proteinebene kommt dadurch zustande, dass unterschiedliche Mengen an f- und s-Isoenzymen synthetisiert werden. Das f : s-Verhältnis beträgt für Allel A 2 : 1, für Allel B 4 : 1 und für Allel C 1 : 4.

Die Molekulargewichte der verschiedenen Isoformen liegen zwischen 18 und 19 kDa (Isoenzym Bs M_r 17,85 kDa; Isoenzym Bf M_r 17,91 kDa). Der EsP wird eine Flavinmononukleotid (FMN) -Phosphatase-Aktivität und eine Phosphotyrosin-Phosphatase (PTPase)-Aktivität zugeschrieben. Sie könnte daher an der Regulation zahlreicher zellulärer Funktionen beteiligt sein. Assoziationen von ACP1 s- und f-Isoformen mit kindlichen Entwicklungsstörungen und hämolytischen Formen des Favismus, einem Krankheitsbild, das nach Ingestion von Favabohnen, aber auch nach Einnahme bestimmter Medikamente und nach bakteriellen und viralen Infektionen auftreten kann, wurden beschrieben. Die Bestimmung der EsP-Phänotypen wurde auch in der forensischen Medizin (Vaterschaftsbestimmung) eingesetzt.



Saure Phosphatasen

PsP

Die saure Prostataphosphatase (PsP, EC 3.1.3.2, M_r 44,57 kDa, Chromosom 3q21-q23) wird unter Androgenstimulation im Wesentlichen nur in den Epithelien der Prostata synthetisiert. Die Genome der PsP und der sauren lysosomalen Phosphatase (LsP) weisen beträchtliche Homologien auf. Es wird daher vermutet, dass sich die beiden Gene aus einem gemeinsamen Vorläufer herleiten. Die Homologie auf Aminosäurenebene beträgt 50 %. Die M_r der glykosylierten sauren Prostataphosphatase beträgt etwa 50 kDa. Sie zirkuliert als Dimer mit einer M_r von etwa 100 kDa. Die Isoformen 2a, 2b und 4 stammen hauptsächlich aus der Prostata. Unter dem Begriff saure Prostataphosphatase wird die Isoform 2a verstanden, die bei Patienten mit Prostatakarzinom vermehrt ist und mit > 95% die Hauptaktivität des Enzyms ausmacht. Im Pankreas und anderen Geweben wird die Isoform 4 synthetisiert, die mit Antikörpern gegen die saure Prostataphosphatase kreuzreagiert. Die Aminosäuresequenz der Isoform 4 entspricht derjenigen der Isoform 2a, Unterschiede bestehen nur im Ausmaß der Glykosylierung. In Spuren kommen Isoformen der sauren Prostataphosphatase auch in anderen Geweben, wie z. B. Neuronen, Thrombozyten, Milz, Leber und Darm vor. Aus diesem Grunde können erhöhte Konzentrationen der sauren Prostataphosphatase bei Pankreasinzellkarzinom, Nierentumoren und Karzinoiden auftreten. Bei Frauen können Spuren von saurer Prostataphosphatase aus den paraurethralen Drüsen stammen, insbesondere bei pathologischen Komplikationen.

Der Nachweis der sauren Prostataphosphatase im Serum oder Plasma kann direkt enzymatisch, enzymatisch nach immunologischer Adsorption (Aktivitätsbestimmungen) oder immunologisch mit Enzymimmunoassays (Massenbestimmung) erfolgen. Als Substrat wird bei enzymatischen Messungen in der Regel das nicht PsP-spezifische α -Naphthylphosphat eingesetzt, das von der sauren Erythrozyten-Phosphatase nur minimal hydrolysiert wird. Da für die direkte enzymatische Bestimmung der sauren Prostataphosphatase keine spezifischen Substrate zur Verfügung stehen, errechnet sich die Aktivität der PsP aus der im Serum (Plasma) vorhandenen Gesamtaktivität der sauren Phosphatasen abzüglich der verbleibenden Restaktivität nach Hemmung mit L⁺-Tartrat. L⁺-Tartrat ist ein kompetitiver Inhibitor der PsP, der das Enzym unter Routinebedingung zu 87 - 92 % hemmt. Wegen der unvollständigen Hemmung wird der Anteil der PsP an der Gesamtaktivität der sauren Phosphatasen um etwa 10 % unterschätzt. Auch die sauren Phosphatasen aus Granulozyten und den retikuloendothelialen Geweben sowie die ubiquitäre saure Phosphatase der Lysosomen sind tartratlabil, sodass die Bestimmung der tartrathemmbar sauren Phosphatasen nicht allein die PsP erfasst.

Die Stabilität der PsP im Serum und Plasma ist zwar bei saurem pH hoch, weniger gut aber unter neutralen Bedingungen. Die PsP unterliegt einem zirkadianen Rhythmus, die Schwankungen während des Tages können bis zu 79 % über und 50 % unter dem Tagesmittel liegen. Die höchsten Werte werden in den Morgenstunden erreicht. Die diagnostische Spezifität und Sensitivität der enzymatischen PsP-Aktivität ist, insbesondere bei niederen Aktivitäten zu gering, um lokalisierte Karzinome im Frühstadium anzuzeigen und um zwischen Hypertrophie, Entzündungen und Karzinomen zu differenzieren.

Es wurde daher versucht, die Spezifität der PsP-Bestimmung durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen das Isoenzym 2a zu verbessern. Monoklonale Antikörper können die PsP zwar spezifisch erkennen, ggf. können mit diesen Antikörpern aber andere karzinomassoziierte Isoenzyme der sauren Prostataphosphatase nicht erkannt werden. Die Konzentration der PsP wird entweder radio- oder enzymimmunologisch bestimmt oder die Aktivität des Isoenzym wird nach immunologischer Trennung von den übrigen Isoenzymen gemessen (immunoenzymatischer Test). Im Immunkomplex bleibt die enzymatische Aktivität der Prostataphosphatase vollständig erhalten. Die Empfindlichkeit dieser Immunoassays ist bei noch lokalisierten Karzinomen der Prostata jedoch nicht mehr als 25 % besser wie die der enzymatischen Messungen.



Saure Phosphatasen

Ungeachtet vom angewendeten Testsystem finden sich, so lange das Prostatakarzinom auf die Drüse begrenzt bleibt, in der Regel keine Erhöhungen der sauren Prostataphosphatase; sie sind oft zu gering, um sie von den nicht malignen Formen sicher zu unterscheiden. Geringe Anstiege der Enzymaktivität bestehen auch bei nicht malignen Erkrankungen (Entzündungen) oder einer Hyperthrophie der Prostata. Nach Kapseldurchbruch und/oder bei Lymphknotenmetastasen ist die saure Prostataphosphatase in der Regel erhöht. Metastasen sind bei 66 - 75 % der Patienten mit erhöhten Werten assoziiert. Werte im Referenzbereich schließen jedoch eine Metastasierung nicht sicher aus. Auch bei fortgeschrittenem Karzinombau und entdifferenzierten Karzinomen kann die Synthese von saurer Prostataphosphatase versiegen, sodass Messwerte im Referenzbereich erhalten werden.

Der Haupthinderungsgrund für die Anwendung dieser Assays ist, dass sie für die Früherkennung von Karzinomen im Vergleich zu dem prostata-spezifischen Antigen nicht genügend sensitiv sind. Es ist generell anerkannt, dass ein gewebespezifisches Glykoprotein, das prostata-spezifische Antigen (PSA) bei der Entdeckung des Prostatakarzinoms der sauren Prostataphosphatase überlegen ist. In solchen Fällen, in denen das prostata-spezifische Antigen im Referenzbereich liegt, die saure Prostataphosphatase jedoch erhöht ist, sollte nach metastasierenden Tumoren anderer Art gesucht werden, nach einem myeloproliferativen Syndrom oder entzündlichen Prozessen im Knochenmark.

LsP

Die lysosomale saure Phosphatase (LsP, EC 3.1.3.2, M, 48.316 kDa, Chromosom 11p11.2-p11.11) ist ein ubiquitär in den Lysosomenmembranen vorhandenes homodimeres Enzym. Die lysosomale saure Phosphatase ist wie die saure Prostataphosphatase durch L^+ -Tartrat hemmbar. Das Genom ist ähnlich aufgebaut wie das der PsP; es besteht eine Sequenzhomologie von 50 %, jedoch keine immunologische Identität. Das Enzym wandert in der Polyacrylamidgelelektrophorese kathodenwärts als Bande 3. Eine zwischenzeitlich angezweifelte komplette Defizienz der lysosomalen sauren Phosphatase wurde einmalig 1970 als eine autosomal rezessive Erkrankung beschrieben, die in früher Kindheit zu intermittierendem Erbrechen, Lethargie, Hypotonie, Opisthotonus und tödlichen Blutungen führte. Bei der Mucopolipidosis II (I-Zell-Erkrankung) und der Mucopolipidosis III, Erkrankungen, die mit multiplen Defekten lysosomaler Enzyme einhergehen, sind die Aktivitäten der LsP nicht vermindert.

TRAP

Die tartratresistente saure Phosphatase Typ 5 (TRAP, tartratresistant acid phosphatase, M, 36,36 kDa, Chromosom 19p13.3-13.2, Genombezeichnung ACP5), ein eisenhaltiges Glykoprotein, kann durch L^+ -Tartrat nicht gehemmt werden. Das Enzym besitzt die höchste Basizität der bekannten sauren Phosphatasen, zeigt die schnellste kathodische Mobilität und wandert daher in der sauren Polyacrylamidgelelektrophorese als Bande 5 (TRAP Typ 5). TRAP Typ 5 kann als Monomer oder nach proteolytischer Spaltung als Dimer aus zwei unterschiedlich großen durch eine Disulfidbrücke verbundenen Untereinheiten von 16 und 23 kDa auftreten. Das Enzym besitzt ein binukleäres Eisenzentrum in der katalytisch aktiven Domäne. Im menschlichen Serum finden sich zu etwa gleichen Teilen zwei tartratresistente saure Phosphatasen, die sich immunologisch gleich verhalten und als TRAP 5a und TRAP 5b bezeichnet werden. TRAP 5a enthält zusätzliche Sialinsäurereste, die in TRAP 5b nicht vorkommen. Nach Entfernung dieser Carbohydrate zeigt TRAP 5a die gleiche elektrophoretische Mobilität wie TRAP 5b, sodass der wesentliche Unterschied beider Enzyme in dem Ausmaß der Glykosylierung besteht. Die beiden Enzyme unterscheiden sich in ihren pH-Optimum (TRAP 5a pH 5,0, TRAP 5b pH 5,8). TRAP 5a kann durch Heparin gehemmt werden.

Unklar ist, ob es verschiedene TRAP 5-Formen mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen gibt. Die bisher einzige in den Datenbanken hinterlegte Sequenz wurde von einer Plazenta c-DNA ermittelt. Bisher wurden nur ein einziges TRAP-Gen und eine einzige mRNA-Spezies bekannt.



Saure Phosphatasen

Da TRAP 5b, nicht aber TRAP 5a mit dem Knochenumsatz korreliert ist, gilt es heute als sicher, dass TRAP 5b aus den Osteoklasten stammt. Die Herkunft von TRAP 5a ist noch unbekannt. Sie wurde in den Gaucherzellen der Milz nachgewiesen; sie stammt möglicherweise auch aus anderen Zellen wie Makrophagen (saure Makrophagen-Phosphatase) oder entsteht durch eine Sialinisierung von TRAP 5b im Serum. Sowohl Osteoklasten als auch Alveolarmakrophagen enthalten TRAP 5b. Ob Alveolarmakrophagen auch TRAP 5a exprimieren, ist nicht bekannt. TRAP 5a findet sich nicht in Osteoblasten.

Der Zusammenhang von Osteoklastenaktivität und tartrathemmbarer saurer Phosphatase ist seit langem bekannt, da die TRAP-Aktivität zur histochemischen Identifizierung von Osteoklasten benutzt wurde. TRAP 5b gilt als Marker für die Knochenresorption und für die Progressionsrate metabolischer Knochenerkrankungen.

Die Rolle von TRAP 5b bei den Resorptionsprozessen am Knochen ist noch nicht völlig geklärt. Osteoklasten setzen Protonen (HCl) und lysosomale Proteinase in den Zwischenraum zwischen Zellen und Knochenmatrix frei. Es kommt zu einer Lyse von Hydroxylapatit sowie zu einer Hydrolyse von Kollagen Typ I und anderen Matrixproteinen. Die hieraus entstandenen Degradationsprodukte werden durch Endozytose in die Osteoklasten aufgenommen. Dort verschmelzen TRAP 5b-enhaltende Vesikel mit den endozytotischen Vesikeln. In diesen transzytotischen Vesikeln werden durch die eisenhaltige TRAP 5b reaktive Oxygenspezies generiert, welche die Matrixproteine angreifen und weiter zerstören. Diese Matrix-Degradationsprodukte (z. B. Kollagen-Crosslinks) und andere werden zusammen mit der noch enzymatisch aktiven TRAP 5b durch die funktionelle sekretorische Domäne in der basolaterale Membran der Osteoklasten in die Blutbahn abgegeben. Möglicherweise ist TRAP 5b auch außerhalb der Osteoklasten an der Knochenresorption beteiligt. Ein natürliches Substrat der TRAP 5b im Osteoid ist noch nicht bekannt. Diskutiert werden Phosphoproteinsubstrate wie Osteopontin, dessen Dephosphorylierung die Adhäsion der Osteoklasten an die Knochenmatrix beeinflussen könnte oder die schützenden Pyrophosphate nach deren Hydrolyse die Knochenresorption begünstigt würde.

Die TRAP 5b aus Makrophagen wird möglicherweise als inaktives Enzym sezerniert, während die aus Osteoklasten stammende TRAP 5b als aktives Enzym in die Blutbahn gelangt. Das in die Blutbahn übergetretene Enzym verliert dann sein binukleäres Eisenzentrum, wird inaktiviert und anschließend durch Proteinase in Plasma und Leber metabolisiert. In dieser Weise können die Leber- und Nierenfunktion keinen Einfluss auf die enzymatisch aktive Form der TRAP 5b ausüben. Werden zum Nachweis von TRAP 5b Assays verwendet, die spezifisch das aktive Enzym erkennen (immunenzymatische Methoden), kann TRAP 5b als ein von Nieren- und Leberfunktion unbeeinflussbarer Marker der Knochenresorption angesehen werden. Die Menge der im Serum gemessenen TRAP 5b widerspiegelt das Ausmaß der osteoklastischen Aktivität innerhalb der vergangenen 24 Stunden. Erhöhte TRAP 5b-Konzentrationen finden sich im Vergleich mit gesunden Erwachsenen bei Kindern und bei Frauen nach der Menopause.

H.-P. Seelig