

Fosfatasi

Le FOSFATASI, o fosfomonoesterasi, appartengono alla famiglia delle IDROLASI, e catalizzano la defosforilazione dei loro substrati permettendo, quindi, la scissione degli esteri fosforici con liberazione di fosfato inorganico.

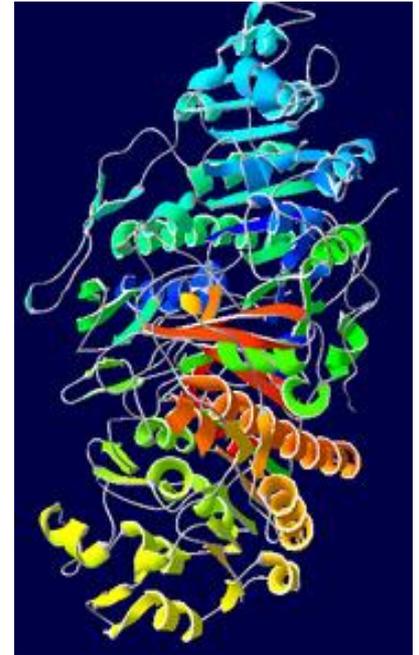


Sono distinti in due principali categorie, in relazione al pH a cui agiscono:

- **Fosfatasi alcalina**, o **ALP**, che ha un pH ottimale compreso tra 8.5 e 10; è localizzata principalmente nella membrana plasmatica.
- **Fosfatasi acida**, o **ACP**, che ha un pH ottimale compreso tra 4.8 e 6; è localizzata principalmente nei lisosomi.

Fosfatasi Alcalina (ALP)

- È largamente diffusa nel regno animale e nei batteri. Nell'uomo si localizza soprattutto nelle ossa.
- È una glicoproteina dimerica che contiene zinco, diffusa in diversi tessuti: mucosa dell'intestino tenue, milza, rene, fegato (canalicoli biliari), ossa (osteoblasti), leucociti, pancreas, placenta:
- Ne sono noti almeno quattro isoenzimi che presentano diversa mobilità elettroforetica e diversa localizzazione tissutale.



L'ALP che viene misurata nel siero è l'insieme di diversi isoenzimi, quindi è importante, in clinica, discriminare l'ALP epatica da quella ossea.

- In condizioni fisiologiche l'ALP totale aumenta nell'accrescimento e in gravidanza;
- in condizioni patologiche, invece, aumenta nell'epatopatie e nelle malattie ossee.

- Valori normali di ALP totale nell'uomo sono:
 - bambini fino a 15 anni <300 UI/L;
 - ragazzi da 15 a 18 anni <400 UI/L;
 - adulti <170 UI/L

I valori elevati di bambini e adolescenti sono dovuti al maggiore ricambio osseo. Talvolta negli adulti ci possono essere valori elevati durante la guarigione da fratture ossee, per una elevata attività osteoblastica.

- Valori superiori alla norma a livello patologico possono essere indice di artrite deformante, carcinoma biliare, epatite, metastasi epatiche e ossee, alterazioni delle vie biliari, mieloma, mononucleosi, osteomielite, rachitismo, sarcoidosi, insufficienza renale, sarcoma osteogenico.
- Valori inferiori possono essere causati da anemia, età avanzata, ipotiroidismo, malnutrizione, arresto della crescita, diminuzione di Zinco e Magnesio. Valori di fosfatasi alcalina bassa si possono trovare in donne che sono in menopausa e alle quali sono stati dati estrogeni per l'osteoporosi oppure in persone affette da celiachie e enterite.
- ☐ La fosfatasi alcalina è presente anche nel latte e viene inattivata dal calore. Il dosaggio dell'enzima nel latte rappresenta quindi un indice dell'avvenuta pastorizzazione (test di pastorizzazione).

Metodi di dosaggio dell'ALP:

Metodo di Bessey, Lowry e Brock:

È il metodo più utilizzato in laboratorio e prevede l'idrolisi di un substrato cromogenico, incolore, con la formazione di un composto che diventa colorato a pH basico (giallo)

- La reazione, nel caso del dosaggio dell'ALP, viene condotta a pH 10.
- La reazione, utilizzando lo stesso metodo per dosare l'ACP, viene condotta a pH 5.

Per discriminare i diversi isoenzimi, il metodo più comune è il **frazionamento al calore**: in tal caso è necessario misurare l'attività enzimatica prima e dopo aver riscaldato il campione 15 minuti a 56°C, sapendo che i diversi isoenzimi hanno diversa stabilità al calore:

- ALP epatica è stabile (come pure ALP placentare)
- ALP ossea (bALP) è labile al calore
- ALP intestinale ha un comportamento intermedio.

Fosfatasi Acida (ACP)

È presente in vari tessuti: nell'uomo, se ne distinguono una di origine eritrocitaria ed una prostatica, il cui aumento in circolo ha particolare interesse per la diagnosi di carcinoma prostatico.

La fosfatasi acida è composta da una varietà di isoenzimi geneticamente eterogenei. Sono descritte quattro forme: eritrocitaria, lisosomiale, prostatica (PAP) e macrofagica.

Tutte le forme di ACP sono codificate da geni poste su cromosomi diversi.

- **Fosfatasi acida eritrocitaria:** codificato da un locus sul braccio corto del cromosoma 2. È una piccola molecola non glicosilata, con massa molecolare 18000 Da.
- **Fosfatasi acida lisosomiale:** codificata da un gene posto sul cromosoma 11, presenta massa molecolare di 52000 Da e una forma dimerica di due subunità identiche.
- **Fosfatasi acida prostatica (PAP):** codificata da un gene sul cromosoma 3, la sua espressione è ormono-dipendente in risposta alla stimolazione ghiandolare da parte degli androgeni. È un dimero con massa molecolare 100000 Da; è un marker biochimico di tumore alla prostata, insieme all'antigene prostatico specifico PSA.
- **Fosfatasi acida macrofagica:** viene codificata da un gene sul cromosoma 19; è composta da 325 amminoacidi ed è un indicatore di malattia ossea e di alcune forme di leucemia.

Valori normali di ACP totale nell'uomo adulto sono:

maschi <10 UI/L (PAP < 4,2 UI/L)

femmine < 3 UI/L

- Valori superiori alla norma della fosfatasi acida totale possono indicare carcinoma alla prostata, emolisi, infarto miocardico, ipertrofia prostatica, malattia di Gaucher, metastasi ossee, mieloma multiplo. Livelli aumentati si riscontrano anche nei fumatori.
- Valori inferiori alla norma della fosfatasi acida possono indicare leucemia.

I diversi isoenzimi di ACP presenti a livello serico si distinguono in base a diversa sensibilità a vari inibitori, quali:

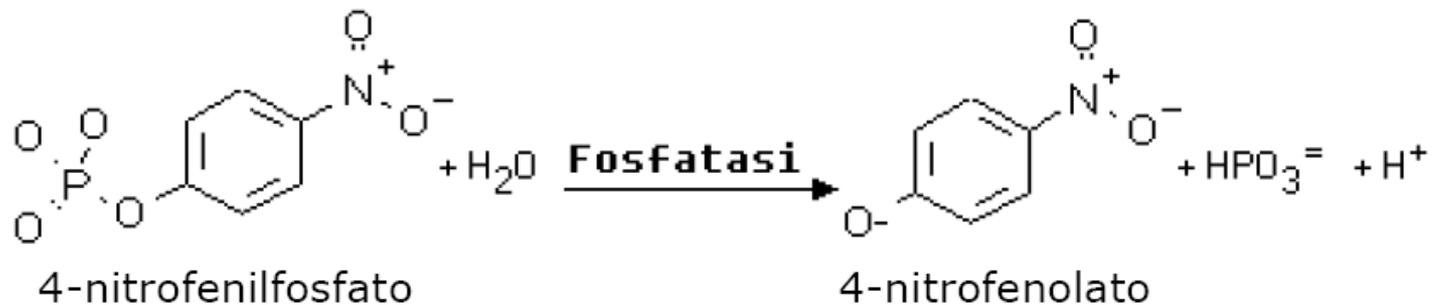
- Acido tartarico, che inibisce l'enzima di origine prostatica;
- Formaldeide, che inibisce l'enzima di origine eritrocitaria.

Metodi di dosaggio dell'ACP:

Metodo di Bessey, Lowry e Brock:

Prevede l'idrolisi da parte dell'ACP di un substrato cromogenico, un estere fosforico incolore (4-nitrofenilfosfato) con la formazione di un composto incolore, il 4-nitrofenolato) che diventa colorato a pH basico (giallo).

- La reazione, nel caso del dosaggio dell'ACP, viene condotta a pH 5.
- È un reazione end-point: cioè la reazione enzimatica viene bloccata con l'aggiunta di NaOH, che sposta il pH della reazione a valori molto alti, bloccando l'attività della fosfatasi acida e rendendo rilevabile il prodotto colorato che mostra un assorbimento a $\lambda=405$ nm.



Dosaggio fosfatasi acida in laboratorio

Il dosaggio viene fatto in doppio con un campione, nel nostro caso leucociti, del quale si desidera testare l'attività enzimatica, e con un bianco della reazione dove il campione è sostituito da tampone.

tampone di reazione: tampone acetato pH 4,8

Blocco di reazione: NaOH 1 M

Substrato: p-Nitrofenilfosfato (pNPP) 5 mM in tampone acetato 50 mM + MgSO₄ 2 mM, pH 4.8

Sia il campione che il bianco della reazione vengono dosati in DOPPIO, dispensandoli in pozzetti a fondo piatto di una micropiastra trasparente da 96 pozzetti

Poniamo che la concentrazione proteica dei vostri leucociti sia **2,5 mg/ml** per il dosaggio della fosfatasi acida avete bisogno, complessivamente di **30 µl di campione 1 mg/ml**

$$FD = \frac{2,5 \text{ mg/ml}}{1 \text{ mg/ml}} = 2,5 \times$$

$$Vi = \frac{Vf}{FD} = \frac{30 \text{ µl}}{2,5} = 12 \text{ µl}$$



12 µl campione 2,5 mg/ml + 18 µl di tampone acetato pH 4,5

- CAMPIONE: 10 μ l di supernatante alla conc proteica 1 mg/ml
 - BIANCO: 10 μ l di H₂O
- Aggiungere ad ogni campione/bianco 100 μ l di substrato
 - Incubare la reazione 30 minuti a 37°C
 - Bloccare la reazione con NaOH 1 M

Letture a $\lambda=405$ nm.

Esempio di RISULTATI ottenuti:

- Abs1 Bianco $\lambda=405$ nm = 0,148 OD
 - Abs2 Bianco $\lambda=405$ nm = 0,144 OD
 - Abs1 Campione $\lambda=405$ nm = 0,364 OD
 - Abs2 Campione $\lambda=405$ nm = 0,356 OD
- Media bianco = 0,146 OD
- Media campione = 0,36 OD

Valore medio netto campione = $0,36 - 0,146 = 0,214$ OD

- Calcolare le medie dei bianchi e le medie dei campioni
- Calcolare i valori netti dei campioni:

$$\Delta A = \text{Abs}_{\text{netti}} \text{ campione} = \text{Abs}_{\text{media}} \text{ Campione}_{\lambda=405 \text{ nm}} - \text{Abs}_{\text{media}} \text{ Bianco}_{\lambda=405 \text{ nm}}$$

- Calcolo **attività enzimatica specifica** (U/mg proteine) dalla formula:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta A}{t * \epsilon * b} * \frac{V_{\text{test}}}{V_{\text{camp}}} = \frac{0,214 \text{ OD}}{30 * 18,5 * 0,8} * \frac{0,210 \text{ ml}}{0,01 \text{ ml}} = 4,82 * 10^{-4} * 21 = 0,010 \text{ U/ml}$$

$$\frac{U}{mg} = \frac{U/ml}{mg/ml} = \frac{0,010}{1} = 0,010 \text{ U/mg}$$

ΔA = Assorbanza media Campione – Assorbanza media bianco

t = tempo di incubazione → 30'

ϵ = 18.5 mM⁻¹cm⁻¹ (a $\lambda=405$)

b = cammino ottico → 0.8 cm

V_{test} = volume totale di test (0.210 ml)

V_{camp} = volume del campione in ml (0.01 ml)

mg/ml = concentrazione delle proteine, nel nostro caso pari a 1 mg/ml



Corso di laurea in Scienze Biologiche
Corso di laurea magistrale in Scienze Biomolecolari e dell'Evoluzione

Materiale didattico di supporto

Tutto il materiale fornito a supporto delle lezioni e reperibile nel minisito dell'insegnamento o sulla piattaforma online UniFE deve essere inteso come traccia degli argomenti svolti e non sostituisce il libro di testo.

Raccomandazione importante: questo materiale didattico è per uso personale dello studente, ed è coperto da copyright. Ne è severamente vietata la riproduzione, la diffusione o il riutilizzo, anche parziale, ai sensi e per gli effetti della legge sul diritto d'autore.