2159

DUODECIM 1963: 79: 723—730

KOLLAGEENIN BIOKEMIASTA[1]

Eino Kulonen

Sidekudos muodostaa solujen välittömän ympäristön ja liittää kollageenisäikeillä solut kudoksiksi ja elimiksi. Sen avulla elimistö myös puolustautuu vahingoittavia tekijöitä vastaan, ja arpikudoksen muodostuminen korjaa syntyneen vaurion. Kun sidekudoksen kollageeni on tavallaan ekstrasellulaarinen eritystuote, se ei ole aikaisemmin saanut osakseen samaa mielenkiintoa kuin intrasellulaariset, etenkin liukenevat proteiinit. Vasta viime aikoina on yleisemmin käsitetty, että arpikudoksen ja muun sidekudoksen muodostus on primaarisen elinvoiman ilmaus, joka ilmenee intensiivisinä ja spesifisinä aineenvaihduntatapahtumina, joita säännöstelevät samat lait kuin kaikkea kasvua ja kehitystä.

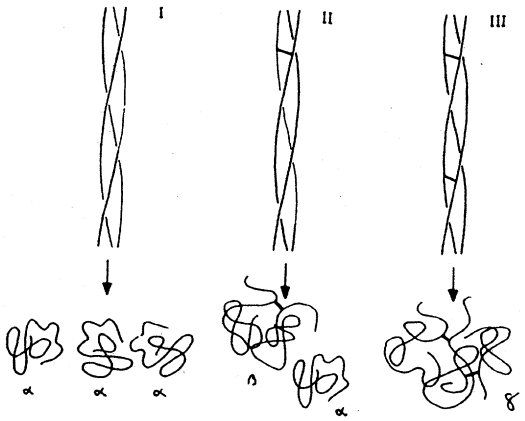
Kollageenisäiettä voidaan tarkastaa monenasteisina suurennoksina, eikä histologisten ja kemiallisten tietojen välillä ole sellaista aukkoa kuin useimpien muiden elimistön rakenneosien kohdalla. Rtg-tutkimusten perusteella tiedetään kollageenisäikeen rakenne atomi atomilta ainakin molekyylin ns. kiteisissä osissa. Kollageenin biokemian tutkimusta on inspiroinut erityisesti tieto kollageenin esiintymisestä myös liukoisessa muodossa, joka kollageenin kypsyessä muuttuu liukenemattomaksi. On kiistanalaista, mitkä kemialliset rakennetekijät määräävät kollageenin liukenemattomuden.

Kollageenin rakenne

Pienin yksikkö on liuoksissa esiintyvä sauvamainen tropokollageenimolekyyli, painoltaan noin 300 000—350 000. Säikeissä nämä

[1]) Soc. Biochem. Biophys. Microbiol. Fenniaen kokouksessa 18. 4. 63 ja II Pohjoismaisella reumajatkokoulutuskurssilla 28. 5. 63 pidettyjen esitelmien mukaan. Alkuperäistutkimuksia ovat tukeneet Sigrid Juséliuksen Säätiö ja U. S. Department of Agriculture.

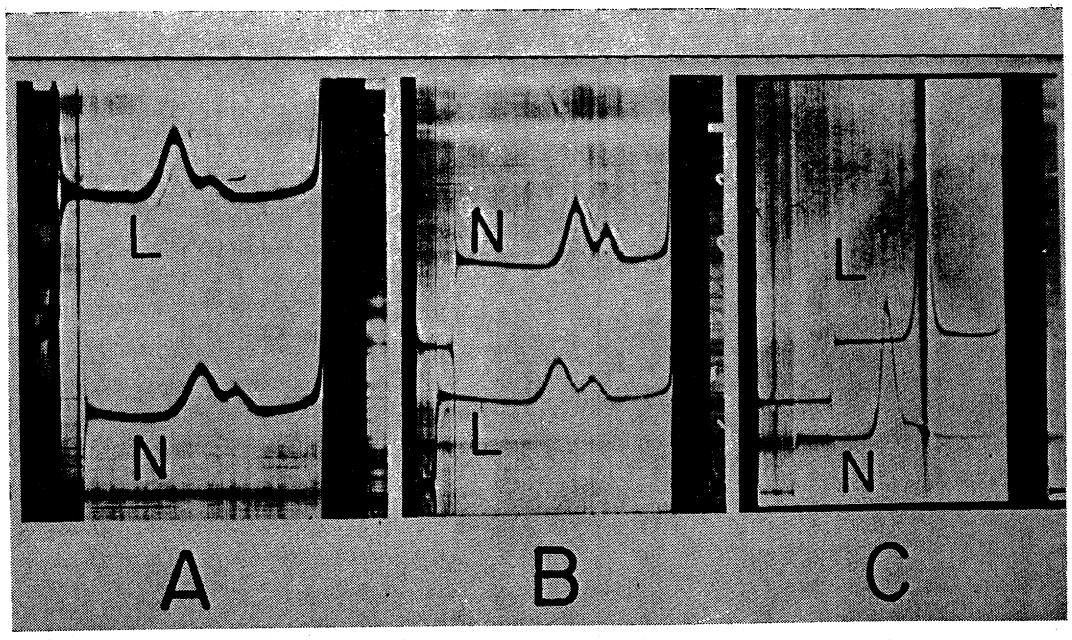
simetylselluloosapylväällä (kuva 5). Viimeksi mainitulla tavalla saadut kaksi fraktiota eivät kuitenkaan enää ole puhtaita α- ja β-komponentteja, vaan ensimmäinen sisältää α_1- ja β_2-komponentit, toinen α_2- ja β_1-komponentit ja viimeinen ns. γ-komponentin, jossa ovat kaikki kolme peptidiketjua yhtyneinä, mutta denaturoituneina. Komponenttien täydellistä resoluutiota ei kuitenkaan ole koskaan saatu aikaan pylväskromatografialla. Tehtyämme melkoisen joukon epäonnistuneita yrityksiä näiden fraktioiden erottamiseksi elektroforeettisin menetelmin saimme tärkkelysgeelissä pH 4.5 asetaattipuskurissa aikaan täydellisen erottumisen (kuva 6). Kuvasta voidaan identifioida edellä mainitut fraktiot, ja lisäksi esiintyy ainakin kaksi muuta, toistaiseksi tuntematonta. Tärkkelysgeeliliuska on mahdollista myös densitometroida ja määrittää siten fraktiot kvantitatiivisesti (kuva 7). Kun denaturoidun kollageenin liuos jäähdytetään, tapahtuu osittaista ketjujen oikenemista eli



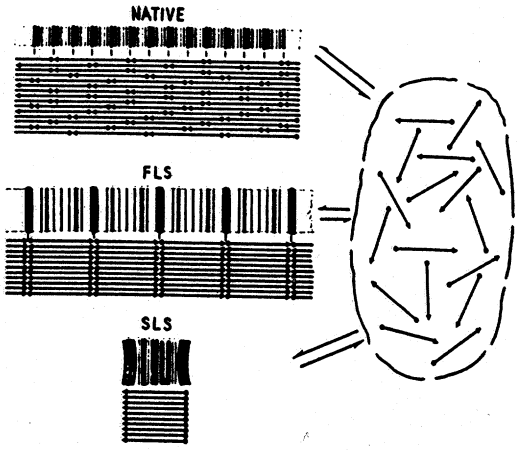
Kuva 3. Kollageenin denaturoituminen α-, β- ja γ-komponenteiksi (Grassmann, Hannig ja Engel 1961).

"renaturaatiota", joka jättää jälkensä elektroforeesidiagrammiinkin, mutta tätä ilmiötä ei toistaiseksi tunneta yksityiskohtaisesti.

Kollageeni sisältää aminohappoja enemmän



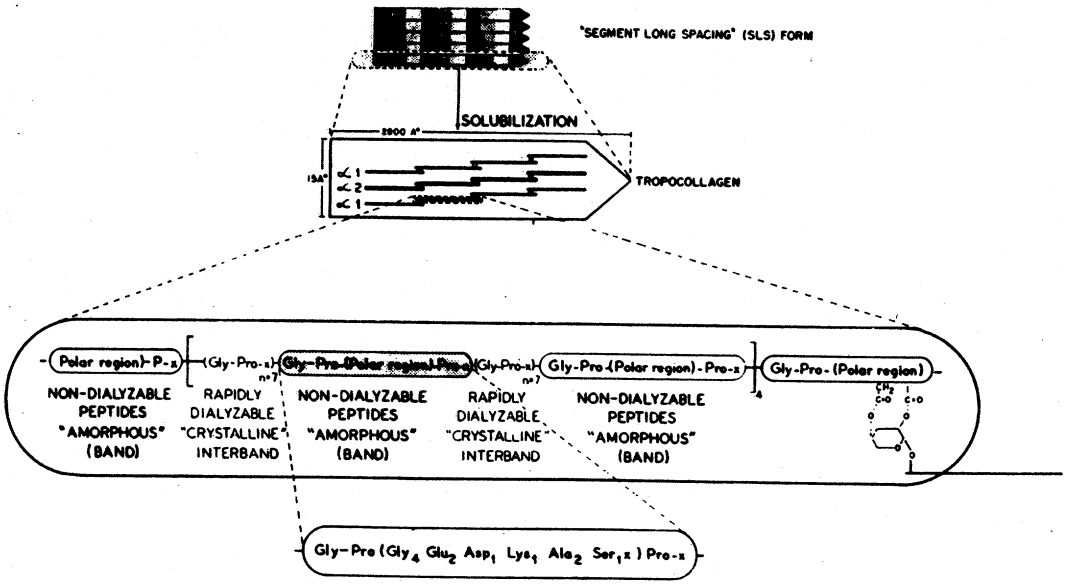
Kuva 4. Rotanhännän kollageenin jakaantuminen α- ja β-komponentteihin ultrasentrifugissa (Nikkari ja Kulonen 1962). N normaali ja L latyristinen näyte. C suolaliukoinen fraktio, jossa on vain α-komponentti.



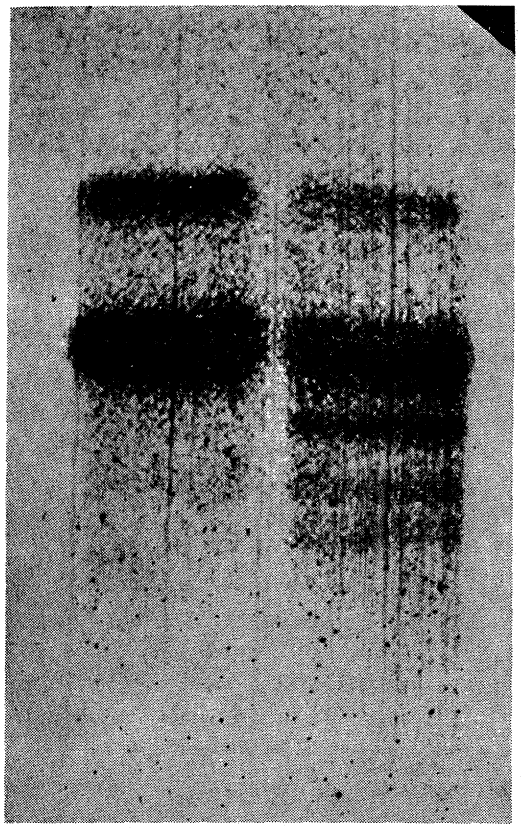
Kuva 1. Kollageenin poikkijuovaisuuden perusteet (Schmitt 1959). Tropokollageenin pituus on neljä kertaa natiivin kollageenin jakson (640 Å) pituus (FLS = "fibrous long spacing", SLS = "segment long spacing").

tropokollageenit ovat asettuneet rinnakkain tyypillisellä tavalla, josta aiheutuu säikeiden elektronioptinen poikkijuovaisuus (kuva 1). Tarkempi käsitys kollageenimolekyylin kolmen peptidiketjun oletetusta rakenteesta saadaan kuvasta 2. Palaan myöhemmin kysymykseen onko olemassa tropokollageenien välisiä sidoksia vai johtuuko kollageenisäikeen vetokestävyys vain tiiviisti yhteen pakkautuneiden tropokollageenimolekyylien välisistä vetysidoksista.

Jokainen tropokollageenimolekyyli koostuu kolmesta rinnakkaisesta spiraalimaisesta peptidiketjusta, jotka jo lievästi kuumennettuina denaturoituvat menettäen tertiaarisen ja sekundaarisen rakenteensa, mutta primaarirakenne säilyy vielä samoin kuin peptidiketjujen väliset intramolekylaariset sidokset (kuva 3). Nykyisen käsityksen mukaan tropokollageenissa on kahdenlaisia peptidiketjuja, α_1- ja α_2-ketjuja. Tropokollageenimolekyylissa voi esiintyä lisäksi näiden kombinaatioita, β-komponentteja, joista β_2 on muodostunut kahdesta α_1-ketjusta ja β_1 yhdestä α_1- ja yhdestä α_2-ketjusta. Aluksi voitiin erottaa vain yleensä α- ja β-komponentit, joko ultrasentrifugoimalla (kuva 4), suoloilla saostamalla tai karbok-



Kuva 2. Tropokollageenin rakenne kaavamaisesti (Franzblau 1962). Fragmentit liittyvät hiilihydraatin välityksellä.



Kuva 6. Suolaliukoisen kollageenin komponenttien fraktioituminen tärkkelysgeelielektroforeesissa (Näntö, Maatela ja Kulonen 1963). Oikealla normaali, vasemmalla latyristinen kollageeni.

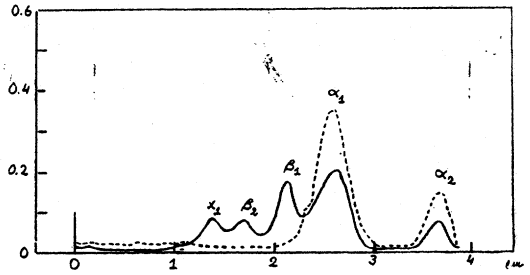
kaasti, että primaaristruktuuritkin hajoavat. Tämän "resistentin" fraktion määrä on eri kollageeneissa erilainen.

Kun liukenematonta säiettä kuumennetaan, niin kaikki kollageeni denaturoituu, mutta osa jää liukenemattomaan muotoon, kutistuu ja muuttuu fysikaalisesti kumin kaltaiseksi. Kimmoisuusteorian[1] avulla voidaan laskea poikittaissidosten väliin jäävän peptidiketjun koko (Mc) mittaamalla tietyn voiman aikaansaama venytys (Wiederhorn ja Reardon 1952). Tämä on sinänsä todiste siitä, että liukenemattomassa kollageenissa todella on poikittaissidoksia tropokollageenien välillä. Olemme tutkineet tällä menetelmällä eri-ikäisten rottien häntäsäikeen ja nahan kollageenia. Vastoin odotusta ei häntäsäikeessä ainakaan kolmen kuukauden iän jälkeen tapahdu poikittaissidosten määrän lisääntymistä, mutta ihossa intermolekylaariset sidokset jatkuvasti lisääntyvät eläimen vanhetessa. Myös tropokollageenin intramolekylaariset sidokset, so. α- ja β-komponenttien suhde, muuttuvat tutkimustemme mukaan iän funktiona.

Liukenematonkin kollageeni sisältää siten varmasti monenlaisia komponentteja, mutta niiden synty iän funktiona, inter- ja intramolekylaaristen sidosten laatu sekä merkitys kollageenin mekaanisia ominaisuuksia ajatellen ovat toistaiseksi melkein tuntemattomia.

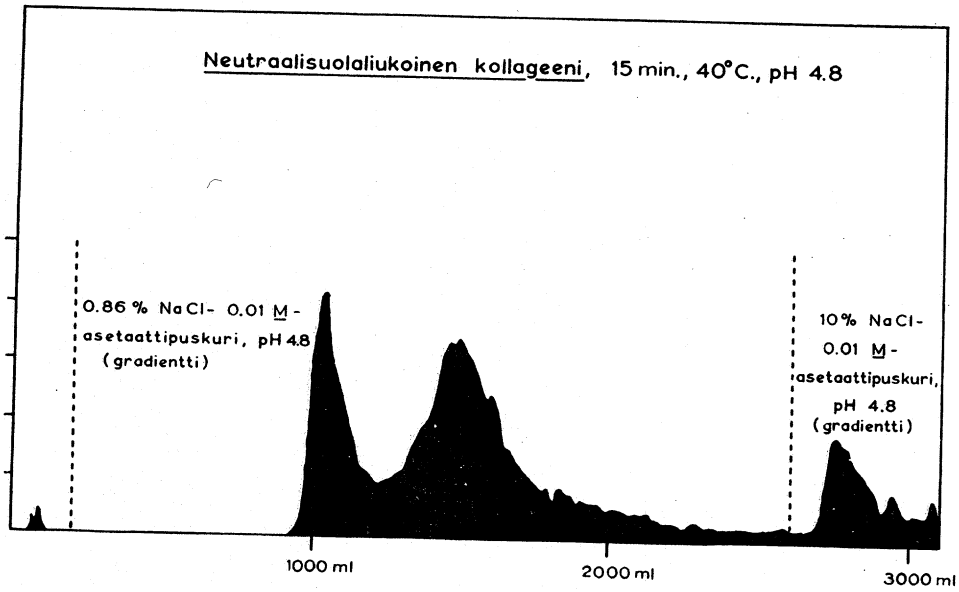
Latyrismi

Latyrismi on hajuherneen ja muiden Lathyrus-lajien siemenissä esiintyvän β-aminopropionitriilin aiheuttama myrkytys, jonka olennainen piirre on kollageenisen sidekudoksen mekaaninen heikkous. Seuraavat kemialliset muutokset on voitu osoittaa kollageenin muodostumisessa: 1. huomattavan suuri osa kollageenista pysyy liukoisessa muodossa; 2. α-yksiköt eivät liity normaalisti β-yksiköiksi (kuvat 6 ja 7); 3. kollageeni ei muodosta nor-



Kuva 7. Kuvan 6 esittämät elektroforogrammit densitometroituina (Näntö, Maatela ja Kulonen 1963). Latyristinen näyte on merkitty katkoviivalla.

[1] $Z = \delta \frac{RT}{Mc}(\alpha - \frac{1}{\alpha^2})$ kun Z on venytysvoima säikeen poikkileikkauksen pinta-alaa kohti, α venyneen ja alkuperäisen säikeen pituuden suhde, δ säikeen tiheys, Mc sidosten välinen molekyylin osa.



Kuva 5. Kollageenin komponenttien fraktioituminen karboksimetylselluloosapylväässä (Pikkarainen, julkaisematon). Sekoitustilavuus 1350 ml. 1000 ml kohdalla esiintyvä fraktio sisältää α_1 + β_2-komponentit, seuraava α_2 + β_1-komponentit ja viimeinen γ-komponentin.

kuin mikään muu animaalinen proteiini, ja se on elastiinia lukuun ottamatta myös ainoa eläinkunnan proteiini, joka sisältää oksiproliinia. Kautta koko kollageenimolekyylin joka kolmas aminohappo on glysiini, mutta amorfiset kohdat (kuva 2) sisältävät polaariset, so. happamet ja emäksiset aminohapot. Kiteisillä kohdilla toistuu rakenne -Gly-Pro-Hypro-Gly-, johon mikro-organismien kollagenaasi vaikuttaa. Puhdistettukin kollageeni sisältää aina pienen määrän neutraalia hiilihydraattia, mutta ei happamia mukopolysakkarideja. Tällä neutraalilla hiilihydraattifragmentilla ajatellaan olevan tärkeä merkitys peptidiketjujen sitoutumisessa toisiinsa sekä sivuittain että päittäin (kuva 2). Sidokset ovat esterisidoksia, jotka ovat katkaistavissa hydroksylamiinilla. Väitetään, että tropokollageenit liittyvät päittäin toisiinsa erityisillä tyrosiinipitoisilla "häntäpeptideillä". Tropokollageenit järjestyvät rinnakkain ilman mitään aputekijöitä.

Kun uutimme liukenematonta rotan hännän kollageenia samoissa lievissä olosuhteissa kuin edellä denaturoitaessa, so. enintään +40°—+60°C:n lämpötilassa, uute sisälsi ehjiä α- ja β-komponentteja. Tämä on merkillepantavaa, sillä yleensä liukenemattomasta kollageenista tehdyt kaupalliset gelatiinit ovat menettäneet kollageenin peptidiketjujen primaarisetkin struktuurit aivan vähäisiä jätteitä lukuun ottamatta. Ns. happamella menetelmällä valmistetut gelatiinit ovat yleensä emäksisempiä, jopa niin, että niiden isoioninen piste vastaa alkuperäisen kollageenin isoionista pistettä ja osa niistä on siten lähellä alkuperäistä kollageenia.

Näyttää siltä, että on olemassa raja, jota lievemmällä kuumentamisella saadaan kaikista liukenevista, mutta myös joistakin liukenemattomista kollageeneista ehjiä α- ja β-yksikköjä. Loppuosa liukenemattomasta kollageenista vain denaturoituu, mutta ei liukene, ennen kuin sitä kuumennetaan niin tehok-

Tutkimuksen pääpaino kohdistui niihin muutoksiin, jotka tapahtuvat granulaatiokudoksen kehityksen alussa. Verenkierto saavuttaa maksiminsa verraten aikaisin, ja vaikka runsas verenkierto on granulaatiokudokselle ominaista, se ei näytä ratkaisevalta kollageenisynteesiä ajatellen. Myöskään hiilihydraatit eivät näytä ratkaisevan tärkeiltä ainakaan myöhemmässä vaiheessa. Voidaan kuitenkin ajatella, että vilkas verenkierto ja hiilihydraattien runsaus olisivat tarpeen soluproliferaation aikaansaamiseksi, mutta eivät enää spesifisessä proteiinisynteesissä.

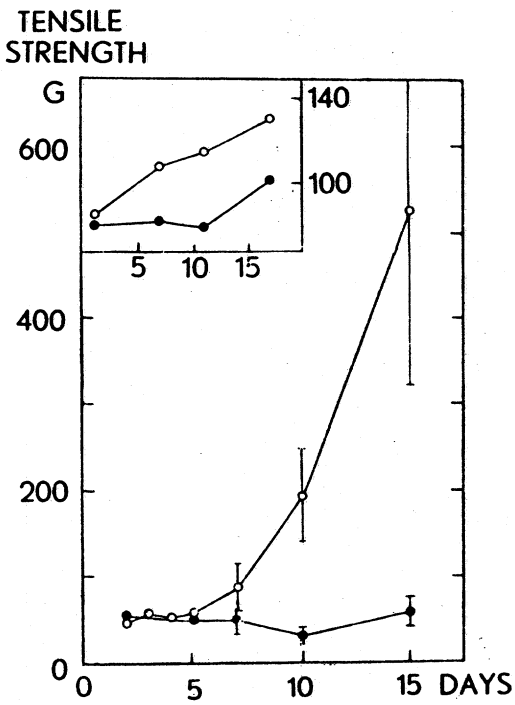
DNA:n määrästä päätellen solumäärän maksimi saavutetaan noin 14. ja 21. päivän välisenä aikana sen mukaan, miten granulaatiokudos on saatu aikaan. Kun tarkoitus on tutkia kudoksen kykyä proteiinisynteesiin, on tarpeen syventyä tarkemmin RNA:n ja solufraktioiden määriin. Sekä kokonais-RNA:n että mikrosomien määrä näyttää olevan suuri jatkuvasti 60 vrk:n ikään asti, vaikka solujen määrä jo laskee. RNA:n ja mikrosomien määrä kuvastavat parhaiten kollageenisynteesin vilkkautta, eivätkä ne muutu paralleelisesti DNA:n määrän kanssa.

Tällä menetelmällä on mahdollista tutkia erilaisten tekijöiden vaikutusta granulaatiokudoksen muodostumiseen, joko antamalla koe-eläimelle haluttuja aineita tai käsittelemällä paloja ennen implantaatiota. Tällä tavalla on tutkittu esimerkiksi eräiden karbonyyliryhmiä sitovien aineiden ja β-aminopropionitriilin vaikutusta (kuva 10).

Alkuperäisenä kannustimena työssämme oli halu kehittää keinoja ihmisen granulaatiokudoksen muodostuskyvyn mittaamiseksi, esimerkiksi ennen leikkausta. Sopivan modifikaation kehittäminen tuntuu hyvinkin mahdolliselta, ja tulevaisuudessa voi olla tapana mitata potilaan arvenmuodostuskyky samoin kuin nykyään verenhyytymiskyky.

Voidaksemme tehdä laajempia ja spesifisempiä tutkimuksia on pakko siirtyä i n v i t r o -tekniikkaan. Silloin ei ole syytä siirtyä pitemmälle hajotettuihin valmisteisiin kuin leikkeisiin, joissa solunsisäinen aineenvaihdunnan integraatio on jäljellä. Tarkoitus on päästä tuntemaan nukleiinihappojen ja proteiinien synteesiä rajoittavia tekijöitä. Tiedon raja on tullut pian vastaan, vaikka arvenmuodostus on jo jokapäiväisen kokemuksen mukaan elintärkeä.

Vaikeutena on tässä vaiheessa se, että liukoisen kollageenin määrä granulaatiokudoksessa on suhteellisen vähäinen, vain sadasosa kaikesta liukoisesta proteiinista, joten on kehitettävä keinot kollageenin komponenttien tutkimiseksi muista proteiineista riippumatta. Emme toistaiseksi ole myöskään voineet soveltaa tärkkelysgeelielektroforeesia preparatiivisesti.



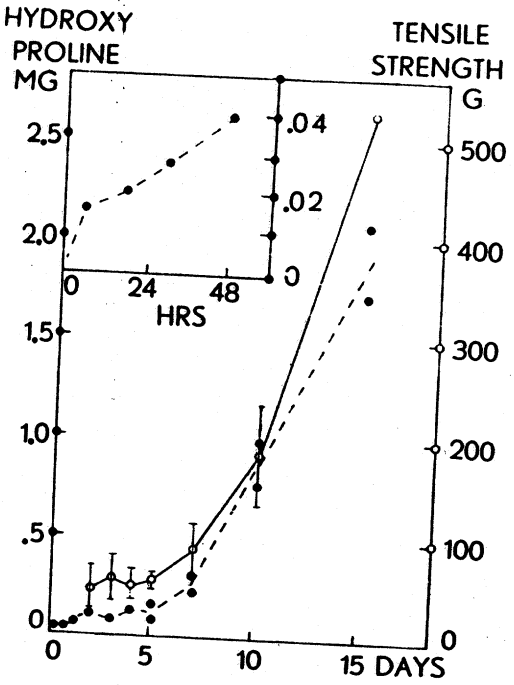
Kuva 10. β-aminopropionitriilin vaikutus granulaatiokudoksen vetokestävyyteen (Viljanto, Isomäki ja Kulonen 1962). Latyristisilla eläimillä tehty koe on merkitty täysillä pisteillä. Kollageenia oli latyristisissa eläimissä muodostunut noin puolet siitä, mitä sitä muodostuu normaalieläimissä, mutta sen mekaaninen kestävyys oli mitätön. Vasemmassa yläkulmassa eläinten painon kehitys.

maaleja "end to end"-aggregaatteja ja 4. se ei myöskään "renaturoidu" denaturoinnin jälkeen yhtä hyvin kuin normaali kollageeni. Vika on joko yksityisissä peptidiketjuissa tai niiden yhtymismekanismissa, mutta joka tapauksessa se rajoittaa kollageenin normaalia kypsymistä. Samanlainen tilanne, jossa liukoisen kollageenin lisääntyminen liittyy säikeiden mekaanisten ominaisuuksien huonontumiseen, esiintyy gravidin kohdun kollageenissa ennen synnytystä. Makromolekylaaristen muutosten seurauksena tai rinnakkaisilmiönä havaitaan muutoksia myös aminohappoaineenvaihdunnassa: aminohappojen inkorporaatio kollageeniin on vähentynyt.

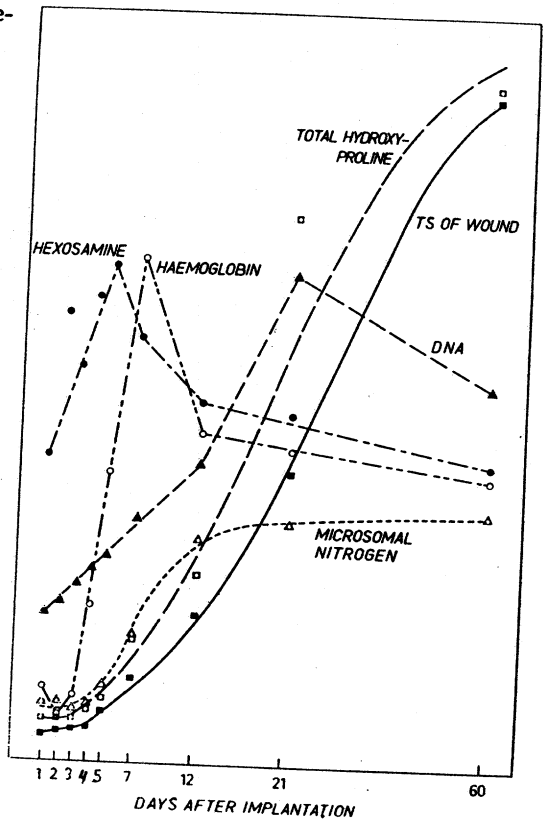
Kun latyrismi tavallaan pitää kollageenin nuorena tai ainakin kypsymättömänä, olemme panneet alulle kokeen tutkiaksemme iäkkäitä koe-eläimiä, joille on koko ikänsä annettu β-aminopropionitriiliä, jolloin kollageenin luulisi pysyneen vetreänä koko iän.

Granulaatiokudoksen aineenvaihdunta

Granulaatiokudoksen spesifisenä tehtävänä on muodostaa kollageenisäikeitä. Se on tavallaan elin, joka syntyy tarpeen mukaan, suorittaa tehtävänsä muodostamalla arven ja sitten surkastuu. Implantoimalla kudoksiin vieraita kappaleita, kuten tavallista selluloosasientä, voidaan keinotekoisesti saada aikaan granulaatiokudoksen muodostuminen kontrolloiduissa olosuhteissa. Tri Viljanto on kehittänyt laitoksessamme menetelmän, jossa käytetään kaksiosaista sientä. Osien väliin muodostuneen kollageenin vetokestävyys voidaan mitata ja korreloida saman kudoksen kemialliseen koostumukseen. Yhteenveto hänen tutkimuksistaan on nähtävänä kuvissa 8 ja 9.



Kuva 8. Granulaatiokudoksen kollageenipitoisuuden (laskettu oksiproliinina) ja vetokestävyyden välinen korrelaatio (Viljanto ja Kulonen 1962).



Kuva 9. Granulaatiokudoksen muutokset kehityksen alkuvaiheissa (Viljanto, julkaisematon), TS vetokestävyys.

Luutuminen ja "kollageenitaudit"

Kollageenilla on tärkeä osuus luukiteiden muodostumisessa ja orientoitumisessa. Tämä ominaisuus liittyy normaaliin jaksoittaisuusuuteen, sillä keinotekoisesti saostetut kollageenisäikeet kalkkiutuvat ainoastaan, jos jaksoittaisuus on normaali, 640 Å. Nimenomaan väitetään, että kollageeni sitoo erityisesti fosforihappoa ja siten muodostaa "ytimiä" luusuolan kiteytymiselle (Glimcher 1959).

Ns. "kollageenitaudeissa" granulaatiokudoksen proliferaatio on usein liiallista ja terapeuttiset toimenpiteet, kuten steroidihoito, kohdistuvat sen hillitsemiseen. On voitu osoittaa, että kortisonihoito vähentää kollageenin synteesiä, mihin perustuu osa kortikosteroidien sekä edullisista että haitallisista vaikutuksista. On usein esitetty kysymys, onko olemassa patologista kollageenia. Kysymykseen ei voida vastata varmasti. Ainoa tarkemmin tunnettu kollageenikudoksen häiriötila on edellä mainittu latyrismi. Kirjallisuudessa on esitetty väite, jonka mukaan kollageeni denaturoituisi erityisen herkästi juuri +37°C:n yläpuolella (Rigby ja Spikes 1960, Rigby 1961), joten kuumetila aiheuttaisi kollageenin ominaisen struktuurin häviämisen ja hajoava kollageeni mahdollisesti olisi alkuna granulaatiokudoksen muodostumiseen. Tähän teoriaan on syytä toistaiseksi suhtautua odottavasti.

Granulaatiokudoksen synty on keskeinen medisiininen perusprobleemi, jonka biokemiallinen tutkimus on laiminlyöty. Sen vuoksi sen tutkiminen on sekä tarpeellista että kannattavaa. Pohjaltaan kysymyksessä on kuitenkin yleisbiologinen probleemi, nimittäin kasvu, sen induktio ja säätely eri vaiheissa. Kollageenisynteesi on myös biokemiallinen perusprobleemi, nimittäin rakenteeltaan erikoisen proteiinin vaiheittainen rakentuminen luonnon keinoilla.

Kirjallisuutta

FRANZBLAU, C.: Thesis, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, New York, 1962.

GLIMCHER, M. J.: kirjassa "Connective Tissue, Thrombosis and Atherosclerosis", toim. I. H. Page, Acad. Press. 1959.

GRASSMANN, W., HANNIG, K. ja ENGEL, J.: Z. physiol. Chem. 1961: *324:* 284.

NIKKARI, T. ja KULONEN, E.: Biochem. Pharmacology 1962: *11:* 931.

NÄNTÖ, V., MAATELA, J. ja KULONEN, E.: Acta Chem. Scand. 1963, painossa.

RIGBY, B. J.: Biochem. Biophys. Acta 1961: *47:* 534.

RIGBY, B. J. ja SPIKES, J. D.: Nature 1960: *187:* 150.

SCHMITT, F. O.: kirjassa "Connective Tissue, Thrombosis and Atherosclerosis", toim. I. H. Page, Acad. Press. 1959.

WIEDERHORN, N. M. ja REARDON, G. V.: J. Polymer Science 1952: *9:* 315.

VILJANTO, J. ja KULONEN, E.: Acta path. microbiol. Scand. 1962: *56:* 120.

VILJANTO, J., ISOMÄKI, H. ja KULONEN, E.: Acta pharmacol. toxicol. 1962: *19:* 191.

Laajempia kirjallisuusviitteitä saatavissa kirjoittajalta.

Summary

Kulonen, E.: ON THE BIOCHEMISTRY OF COLLAGEN

A survey is given of recent developments in collagen biochemistry with reference to granulation tissue and lathyrism. On the basis of the author's investigations it is emphasized that:

1) by heating all the soluble and a part of the insoluble collagen, it can be broken into intact α- and β-components, which can be fully separated by means of gel electrophoresis;

2) the remaining part of the insoluble collagen is made soluble by heat if the primary structure of collagen is also broken down;

3) the intermolecular and intramolecular bonds change with advancing age;

4) in lathyrism, there is a defect on the macromolecular level;

5) in granulation tissue, the content of RNA and microsomes (but not of DNA) correlates best with the amount of collagen.

Turun Yliopiston lääketieteellisen kemian laitos