

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
MEDICINSKI FAKULTET  
DOKTORSKE AKADEMSKE STUDIJE

Smer: Kardiologija

Predmet: Metodologija istraživanja u biomedicinskim naukama

Kurs: Biohemijske metode ispitivanja u medicini

Mentor: prof. dr Tomislav Stojanović

**BIOHEMIJSKA ORGANIZACIJA  
EKSTRACELULARNOG MATRIKSA**

Kandidat

Sladana Raković br. indexa 2006/62

Septembar 2007 godine

Kada se razmatra struktura tkiva, fokus je obično na ćelijskoj komponenti. Često se previdi da se oko ćelija nalazi mreža makromolekula. Prostor između ćelija, odnosno intersticijum, ispunjen je supstancom kompleksnog sastava, koja se označava kao ekstracelularni matriks (ECM). Ova formacija održava oblik i bez nje fiziološke funkcije i razvoj kardiovaskularnog, nervnog, digestivnog i ostalih sistema sistema ne bi bili mogući iz razloga što su funkcija i razvoj ovih sistema potpuno zavisni od fiksnog prostornog odnosa komponenti tkiva i od permanentnog oblika. U literaturi se navodi da je evolucija jednoćelijskog organizma u višećelijske, bila i evolucija vezivnog tkiva (Scott, 1975) (1).

ECM je klasično opisivan kao strukturna osnova (na osnovu saznanja mikroskopom), sastavljena od proteinskih vlakana i "amorfne supstance" (proteoglikan), koja ne pokazuje definisanu strukturu. Vladalo je mišljenje da je ECM statička struktura, sa ograničenima mogućnostima uticaja na strukturu tkiva, funkciju, razvoj i gensku ekspresiju. Sada se zna da je ECM dinamička struktura, koja reguliše ponašanje ćelija, što se ostvaruje kroz interakciju molekula ECM sa ćelijama, međusobnu interakciju molekula ECM i interakciju sa faktorima rasta. Vremenom se razvio "koncept jezgra" (core concept) koji podrazumeva da je ECM sistem nerastvorljivih vlakana i solubilnih polimera, jasno definisane strukture i organizacije, sa osnovnom funkcijom održavanja oblika tkiva.

Tri glavna konstituenta ECM su:

- kolagena vlakna
- adhezivni proteini koji formiraju mrežu
- interfibrilarni solubilni polimeri- proteoglikani.

ECM ima širok spektar različitih funkcija, od kojih su najznačajnije:

- uspostavlja mehaničku vezu između ćelija
- razdvaja ćelije i različite tkivne forme jedne od drugih
- formira strukture sa specifičnim mehaničkim mogućnostima (kao što je kost, hrskavica, tetive i zglobovi)
- obrazuje filter glomerularne bazalne membrane u renalnim korpuskulima
- obezbeđuje put za migraciju ćelija, što je od značaja za embrionalni razvoj
- sprečava širenja mikroorganizama.

U mnogim vrstama tkiva, kao što je mišićno tkivo i tkivo jetre, ECM zauzima jedino uzani prostor između ćelija, a u drugim vrstama tkiva rasporedjen je tako da zauzima veći prostor. U vezivnom tkivu hrskavice i kosti, ECM je naročito jako izražen i predstavlja u suštini funkcionalni deo tkiva. Deluje kao šok absorber, tako da ublažava prenos pritiska između mineralizovanih jedinica.

Jedan od osnovnih strukturnih elemenata ECM je **kolagen**, koji se pojavljuje u formi nerastvorljivih vlakana, fibrila, mreže i ligamenata. Osnovna karakteristika kolagenih vlakana je fleksibilnost. Termin koji se povremeno sreće u literaturi, „glue producer“ (onaj koji proizvodi lepljivost), potiče od svojstva kolagena da se kuvanjem kao dekompozicioni produkt stvara želatinozna supstancija (2).

Do sada je poznato 19 različitih vrsta kolagena, koje se označavaju rimskim brojevima. Svaka od ovih vrsta ima jedinstvene funkcionalne mogućnosti i tkivno specifičnu distribuciju, tako da kost sadrži najviše kolagena tipa 1, hrskavica kolagen tip 2, a skeletni mišići kolagen tip 1 i 3. Tip 1, 2 i 3 predstavljaju 90 % kolagena, uglavnom se javljaju u formi fibrila, dok tip 4 kolagena formira mrežu i prisutan je u glomerulima

bubrega. Ovakav sastav i forma kolagena obezbeđuju filtrirajuće efekte glomerularne bazalne membrane (GBM) i selektivnost u filtriranju na osnovu veličine molekula.

Strukturu kolagena čini trostruki heliks, sačinjen od tri polipeptidna lanca, koji se označavaju kao  $\alpha$  lanac (Slika 1). Različiti tipovi kolagena sadrže različite kombinacije  $\alpha$  lanaca, tako da tip 1 kolagena sadrži  $2\alpha 1$  i  $1\alpha 2$  lanac (Slika 2). U regionu trostrukog heliksa triplet Gly- X- Y konstantno se ponavlja i svaka treća aminokiselina u ovoj sekvenci je glicin. Prolin se često nalazi na poziciji X ili Y, a poziciju Y zauzimaju hidroksilirane aminokiseline, kao što su 4- hidroksiprolin (4Hyp), 3- hidroksiprolin (3Hyp) ili 3- hidroksilizin (3Hyl). Hidroksilirane aminokiseline nastaju nakon biosinteze proteina, hidroksilacijom aminokiselina u polipeptidnom lancu i predstavljaju karakteristične komponente kolagena.

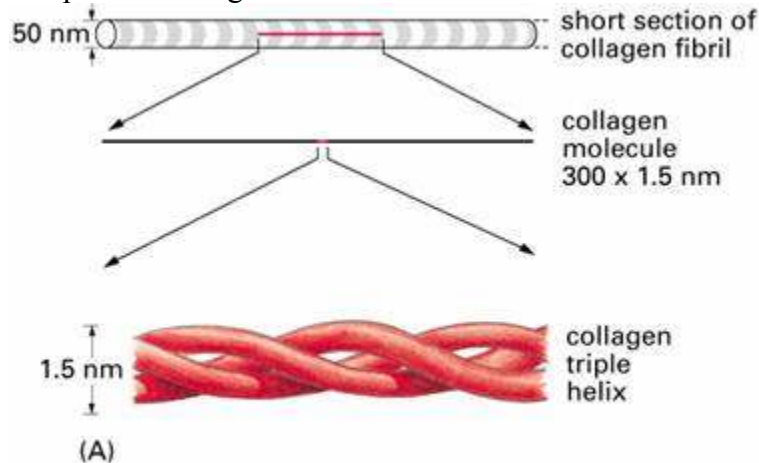
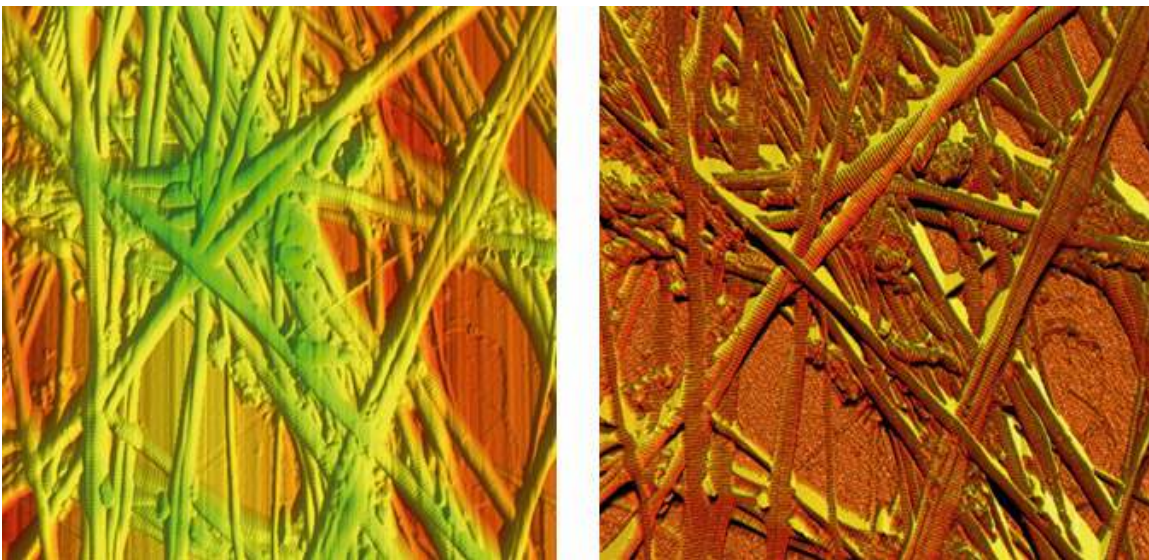


Figure 3-28 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Slika 1. Trostruki heliks



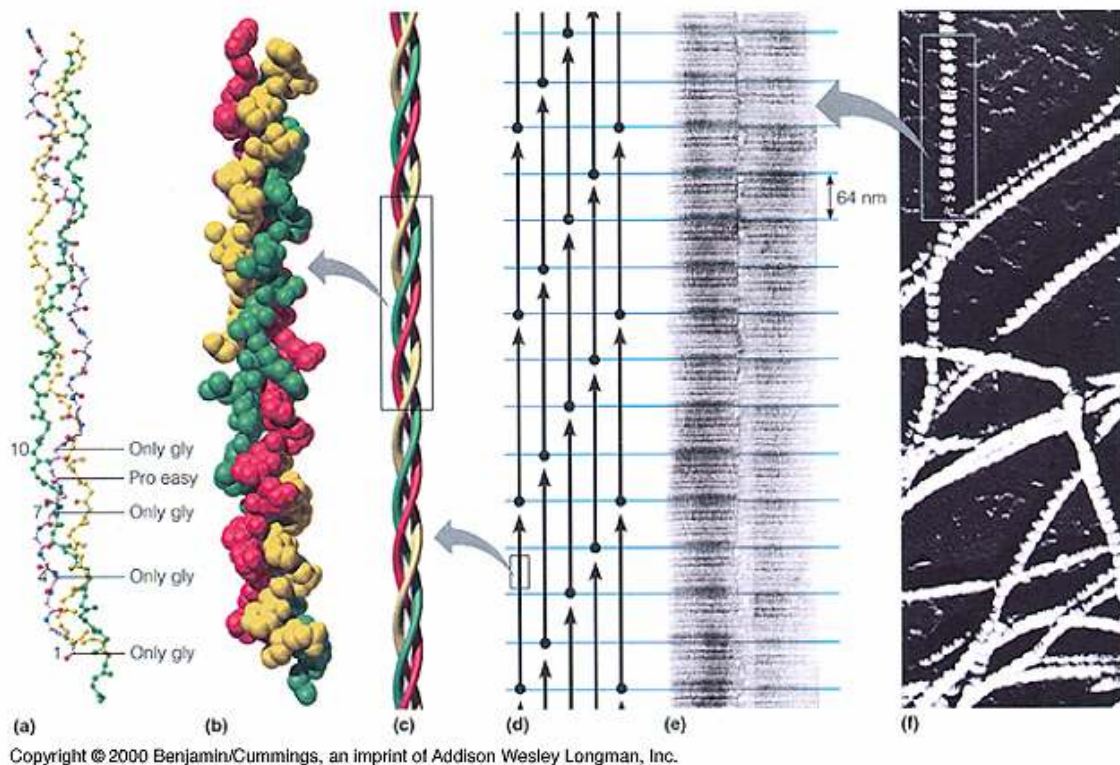
Slika 2. Kolagen tip 1

Stvaranje formacije koja sadrži Hyp i Hyl rezidue u okviru prokolagena, katalizuje oksigenaza, odnosno prolin i lizin- hidroksilaza. U toku ovih reakcija, askorbinska kiselina, odnosno vitamin C ima značajnu ulogu u održavanju funkcije. U tom smislu znatan deo simptoma deficita vitamina C koji nastaju u skorbutu, potiče usled poremećene biosinteze kolagena.

Rezidue hidroksiprolina stabilizuju trostruki heliks formiranjem vodoničnih veza između  $\alpha$  lanaca.

Agregacijom brojnih molekula tropokolagena, koji su čvrsto međusobno povezani, formira se definitivni oblik kolagena, fibrile cilindričnog oblika, veličine 20- 500 nm u dijimetru. Posmatranje fibrila elektronskim mikroskopom, pokazuje ponavljajuće obrasce povezivanja elemenata na određenom rastojaju, odnosno na svakih 64- 67 nm.

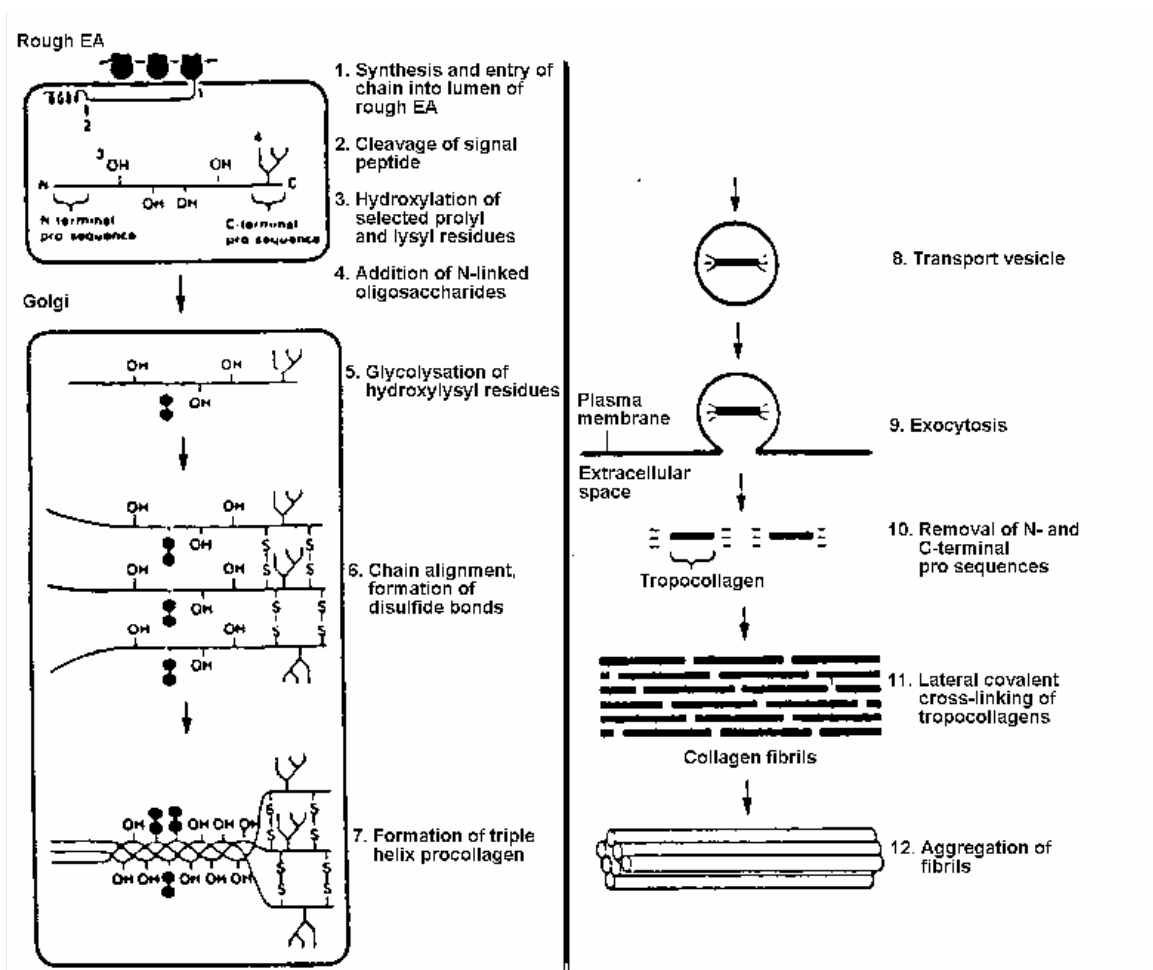
U vlaknima, molekuli kolagena postavljeni su paralelno, ali postoji preklapanje sa molekulima u susedstvu sa  $\frac{3}{4}$  njihove dužine (preklapanje sa molekulom kolagena koji je ispred i iza). Kolageni molekuli privlače i ojačavaju jedni druge, tako da se ne stvori slaba tačka koja bi omogućila transverzalnu rupturu, koja može nastati u toku stresa tokom istežanja. Polipeptidi u kolagenim vlaknima, orjentisani su duž linija sile, što omogućava da podnesu silu istežanja i pritisak ( Slika 3).



Slika 3. Trostruki heliks, agregacija molekula tropokolagena i preklapanje

Biosinteza kolagena predstavlja veoma kompleksnu seriju reakcija. Nakon procesa transkripcije i translacije, prekusorni molekul *preprokolagen*, stvara se u endoplazmatskom retikulumu i podleže intracelularnoj modifikaciji koja se odigrava u Golgi aparatu i endoplazmatskom retikulumu, a obuhvata pet reakcija. Od prekusornog molekula, dejstvom enzima prokolagen- prolin- 4 dioksigenaza (u prisustvu askorbinske kiseline i Fe), nastaje *prokolagen*, koji je i dalje veliki molekul. Većina rezidua prolina i neke rezidue lizina bivaju hidroksilirane (enzim koji katalizuje ovu reakciju je prokolagen- lizin- 5 dioksigenaza, u prisustvu askorbinske kiseline i Fe). Nakon faze hidroksilacije, sledi faza glikozilacije na mestu rezidua hidroksilizina (enzim je protein-lizin-6-oksidaza, u prisustvu bakra). U propeptidu se formiraju intra i inter molekulske disulfidne veze, koje omogućavaju zauzimanje korektno pozicije lanca za formiranje trostrukog heliksa.

Nakon ovih faza, prokolagen se može sekretovati u ekstracelularni prostor procesom egzocitoze. Ekstracelularna proteinska modifikacija podrazumeva uklanjanje N- i C-terminalnih propeptida proteolizom, što dopušta agregaciju molekula tropokolagena u formu fibrila. U završnoj fazi nekoliko amino grupa u rezidui lizina, oksidacijom se konvertuje u aldehidne grupe i formiraju se kovalentne veze izmedju molekula, čime fibrile dobijaju svoju konačnu strukturu i stiču otpornost na dejstvo proteinaza (3) (Sl. 4).



Slika 4. Biosinteza kolagena

Molekuli kolagena skupljaju se spontano u vlakna, pod fiziološkim uslovima. U suštini, dijametar fibrila u tkivima je često determinisan individualnim karakteristikama ECM. Deblja vlakna su suštinski jača od tanjih vlakana. Međutim, kolagena vlakna kod mlađih osoba su cilindričnog oblika i često dosta tanja nego u starijem tkivu, u kom je poprečni presek vlakana uglavnom iregularan, verovatno usled fuzije tanjih fibrila, koje formiraju deblje fibrile. Zadebljanje vlakana je jedan od najočiglednijih fenomena vezanih za starenje tkiva.

Najtanja kolagena vlakna su penta-fibrile, u okviru kojih se nalazi pet kolagenih molekula u formi prstena. Dijametar ovih vlakana je 4 nm, uz poštovanje principa preklapanja sa susednim molekulima, što obezbeđuje optimalano intramolekulsko privlačenje. Međutim, najtanja vlakna koja se mogu posmatrati u tkivu, su debljine 10 nm. Mnogo deblja vlakna, dijametra većeg od 25 nm, koja se uobičajena u većini tkiva, pojavljuju se u vidu agregata, koji lako i reverzibilno podležu disocijaciji u protofibrile dijametra 10 nm. Proteoglikani verovatno igraju ulogu u ograničavanju lateralnog rasta fibrila jer postoje podaci da tkiva sa visokim procentom proteoglikana pokazuju tendenciju da imaju tanka kolagena vlakna. Delimično se ova pojava objašnjava time što interfibrilarni gel predstavlja prepreku za fuziju fibrila. Kako ECM sazreva, količina perifibrilarnog gela se smanjuje (kao u tetivama starijih osoba, gde postoji insuficijencija perifibrilarnog gela), povećava se mogućnost fuzije, fibrile su deblje i dobijaju čvorastu strukturu (čvoraste fuzije). Suprotno, kada se stvara novo vezivno tkivo u zrelom tkivu (fibroza jetre), nova kolagena vlakna su tanka i asocijaju sa znatnom količinom proteoglikana (4).

**Adhezivni proteini** obezbeđuju vezu između različitih komponenti ECM. Ovoj grupi pripadaju *elastin*, *laminin* i *fibronektin*. Adhezivni proteini su multifunkcionalni, jer se istovremeno vezuju za nekoliko različitih komponenti matriksa.

*Elastin* je protein sa visokim stepenom elastičnosti.

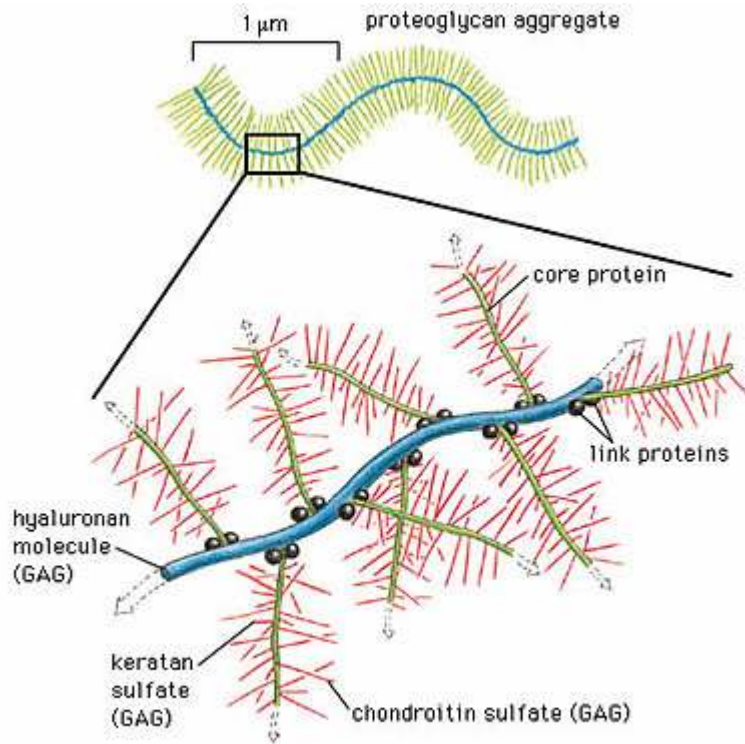
Reprezent adhezivnih proteina je *fibronektin*. To je filamentozni dimer, sastavljen od dva peptidna lanca (svaki je mase 250 Kda), povezanih disulfidnim vezama. Molekuli fibronektina podrazumevaju prisustvo različitih domena, kojima se vezuju za receptore na površini ćelija, kolagen, fibrin i različite proteoglikane. Upravo ova osobina daje fibronektinu karakteristiku „molekularne lepljivosti“.

Struktura domena u molekulu fibronektina podrazumeva nekoliko tipova peptidnih modula, koji se ponavljaju. Do sada je poznato više od pedeset modula, a svaki od njih je kodiran. Modul kome se pripisuje odgovornost za osobinu adhezije fibronektina, podrazumeva karakterističnu aminokiselinsku sekvencu – Arg-Gly-Asp-Ser-. Fibronektin se vezuje za površinu ćelija preko rezidua koje se nazivaju integrini.

**Proteoglikani** su ogromni molekulski kompleksi, sastavljeni od ugljenih hidrata, kojih ima 95 % i proteina 5 %. Zbog svog polariteta i negativnog naelektrisanja vezuju molekule vode i katjone, čime se indukuje osmotsko bubrenje, pa ovi molekuli zauzimaju dosta prostora i na taj način preuzimaju pritisak i sprečavaju kolaps tkiva. Kao homogeni „cement“, proteoglikani ispunjavaju međuprostor između vlakana ECM.

U osnovi proteoglikanskog molekula nalazi se *hijaluronat*, koji obezbeđuje oblik i strukturu molekula. Bočno se nalaze glikozaminoglikani, sastavljeni od ponavljajućih disaharidnih jedinica, koje su kovalentnim vezama vezani za centralni protein jezgra (core protein) (Slika 5). Svaka od ovih disaharidnih subjedinica sadrži iduronat, uronsku ili glukuronsku kiselinu i jedan amino šećer (N-acetilglukozamin ili N-acetilgalaktozamin). Mnogi od amino šećera su esterifikovani u sulfate, što dalje

povećava njihov polaritet. Na osnovu sastava disaharidnih jedinica, razlikujemo četiri grupe glikozaminoglikana: *dermatan sulfat* ( u čiji sastav ulazi iduronat i N-acetil-galaktozamina), *keratan sulfat* (glukuronska kiselina i N-acetil-glukozamin), *heparan sulfat* (glukuronska kiselina i N-acetil-glukozamin) i *hondroitin sulfat* (glukuronska kiselina i N-acetilgalaktozamin).



Slika 5.  
Struktura  
proteoglikanskog  
molekula

Ovakav bifunkcionalni karakter glikozaminoglikana omogućava da se proteinski deo vezuje za kolagene fibrile na specifičnim mestima, a glikozaminoglikani se sakupljaju, držeći kolagene fibrile na definisanom rastojanju. Dakle, postoji red i organizacija između hidrosolubilnih glikozaminoglikanskih komponenti ECM, što verovatno predstavlja ključ supramolekulske organizacije ECM (5). Primer ovakvog funkcionisanja je kornealna stroma, gde dijametar fibrila i interfibrilarni prostor ne sme biti signifikantan, jer će tkivo biti neprozirno. Dugo je bilo nejasno kako kolagene fibrile održavaju regularni raspored i odstojanje uprkos ekstenzivnim supramolekulskim kompleksima, što se zapravo postiže rasporedom GAG lanaca. U starijem životnom dobu, glikozaminoglikanske komponente nisu tako dobro organizovane, naročito ako postoji oštećenje slobodnim radikalima. Kolagene fibrile se tada približavaju, interferiraju sa prolaskom svetlosti, što dovodi do slabljenja vida. Kapacitet prevencije fuzije kolagenih fibrila smanjuje se sa godinama života. Ovakav primer ilustruje značaj supramolekulske organizacije u održavanju funkcije ECM (6).

Proteoglikani su na osnovu veličine i strukture podeljeni na male, velike i veoma velike. Mali proteoglikani imaju globularne proteine sa jedan ili dva glikozaminska lanca iz grupe keratan ili hondroitin sulfata. Veliki i veoma veliki proteoglikani imaju najmanje

jedan polipeptidni domen sa sa 5, 10 ili više (do 100) glikozaminskih lanaca. Veoma veliki proteoglikani su odgovorni za elastična svojstva hrskavice i zglobova .

Proteoglikani vezuju velike količine vode i ispunjavaju međuprostore između fibrilarnih komponenti ECM u formi hidriranog gela. Ova osobina obezbeđuje jednu od bitnih funkcija ECM, inhibicija širenja patogenih mikroorganizama.

Proteoglikani mogu regulisati fibrilogenezu kolagena, učestvuju u modulaciji odgovora ćelija na faktore rasta, inhibiraju ćelijski rast i predloženo je da igraju važnu ulogu u tkivnoj diferencijaciji.

Kada se govori o procesu fibrilogeneze kolagena, navodi se značaj dekorina. Dekorin je po sastavu hondroitin/dermatan sulfat proteoglikan i vezuje se za kolagen tip 1 i 2. Dekorin se vezuje sa kolagenom u zoni međuprostora između susednih molekula kolagena. Eksperimenti in vitro pokazuju da reakcija između proteina jezgra dekorina i kolagena, podržava fibrilogenezu kolagena. U okviru eksperimenata in vivo, gde su kao eksperimentalne životinje korišćeni miševi, pokazano je da oštećenje gena koji kodira dekorin, dovodi do iregularnog izgleda kolagenih fibrila po veličini i obliku (Danielson 1997). Koža miševa je pokazivala veliki stepen fragilnosti. Ovo je istovremeno primer značaja međusobne interakcije molekula ECM (7).

Interakcija komponenti ECM sa ćelijama, odigrava se preko *integrina* koji se nalaze na površini ćelije. Integrini su heterodimeri, sastavljeni od  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice. Postoje brojni izoformni oblici subjedinica za svaki integrin, sa distribucijom specifičnom za tkiva. U okviru integrina razlikuje se ekstracelularni domen, za koji se vezuju proteini ECM i intracelularni domen , koji se vezuje za mrežu ćelijskog citoskeleta. Integrini, verovatno igraju kritičnu ulogu u procesu miogeneze tokom stadijuma proliferacije i diferencijacije miofibrila, učestvuju u regulaciji migracije ćelija, što pokazuje veliki značaj komunikacije ćelija sa komponentama ECM (8).

Razumevanje i poznavanje strukture i funkcije ECM je od velikog značaja kako u fiziološkim , tako i u patološkim uslovima i u tkivu tokom procesa starenja.

## Literatura

1. Scott JE, Physiological function and chemical composition of pericellular proteoglycan, 1975
2. Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape, John E. Scott, 1995
3. Thieme, Color Atlas of Biochemistry, 2005
4. Scott JE Parry Dad, Control of collagen fibril diameters in tissues. International Journal of Biological Macromolecules 14
5. Scott JE, Supramolecular organisation of extracellular matrix glycosaminoglycans in vitro and in the tissues. FASEB Journal 6, 1992
6. Sebag J, Age related changes in human vitreous structure. Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophtalmology
7. The Role of Extracellular Matrix in Skeletal Muscle Development, Sandra G. Velleman, 1998
8. Katz, B. Z., and K. M. Yamada, Integrins in morphogenesis and signaling, 1997.