



## Happi solujen toimintojen säätelijänä

Mikko Nikinmaa

**Elämä maapallolla nykymuotoisena olisi mahdotonta ilman happea. Happi osallistuu mitokondrioiden energiantuotantoon vastaanottamalla elektroninsiirtoketjun elektronit. Niin hengityselimistö kuin verenkiertokin ovat kehittyneet, jotta hapen saanti energian tuotantoa varten olisi riittävää. Koska happi on välttämätön energiantuotannossa, on sen merkitystä solujen muiden toimintojen säätelyssä pidetty viime vuosiin asti vähäisenä - on ajateltu, että hapella ei olisi merkitystä solutoimintojen säätelyssä, koska energiantuotannon taso pitkälti määrää sen pitoisuuden eri puolilla elimistöä. Viime vuosina on kuitenkin osoittautunut, että happi toimii monipuolisesti niin kalvotoimintojen, geenien ilmenemisen kuin solun sisäisen viestinnän säätelijänä. Happipitoisuuden muutokset näyttävät vaikuttavan niin yksilönkehitykseen kuin sairauksien syntyyn ainakin näennäisesti energiantuotannosta riippumattomasti.**

Eri eliöt ja niiden solut joutuvat kokemaan huimia vaihteluita happipitoisuudessaan. Ympäristön happipitoisuuden päivittäiset vaihtelut ovat suurimmillaan rehevissä vesissä, joissa eliöiden hengitys ja eloperäisen aineksen oksidaatio kuluttavat öiseen aikaan happea voimakkaasti, jopa niin, että vesipatsas voi tulla täysin hapettomaksi, anoksiseksi. Päiväsaikaan vihreiden kasvien yhteytys tuottaa happea, jolloin veden happipitoisuus voi nousta moninkertaiseksi ilmakyllästeiseen veteen nähden. Jos vihreiden kasvien yhteytys ei ole mahdollista veden sameuden tai jääpeitteen takia, voi vesi olla vähähappista tai hapetonta pitkäänkin kuten usein trooppisissa vesissä tai jäätyvissä vesistöissä talvisaikaan. Veden hapen osapaineen suuri vaihteluihin verrattuna ilman happipitoisuus on hyvin tasainen. Vähähappisia ympäristöjä esiintyy lähinnä kaivautuvien eläinten koloissa ja vuoristoissa. Näissäkin tapauksissa hapen pitoisuus on vesiympäristöön verrattuna hyvin korkea - ilmakyllästeisen veden happipitoisuus on jokseenkin sama kuin ilmakehän n. 23 km korkeudessa.

Ympäristön happipitoisuuden vaihtelut heijastuvat eliöiden sisäiseen hapen saatavuuteen. Solujen käytettävissä olevan hapen määrään vaikuttaa myös eliön eri kudosten hapenkulutus. Korkeimmillaan elimistön hapen osapaine on hengityselimissä ja valtimoveressä - useimmiten lähellä ympäristön hapen osapainetta. Normaalin ilmakehän hapen osapaine on n 20 kPa ja valtimoveren hapen osapaine 13-15 kPa. Elimistön solujen kuluttaessa happea laskee veren hapen osapaine siten, että hiussuoniverkon loppupäässä ja laskimoveressä hapen osapaine on 3-4 kPa. Elimistön hapenkulutuksen kasvu rasituksen yhteydessä aiheuttaa laskimoveren hapen osapaineen laskun lepotilaa paljon alhaisemmaksi, usein 1-2 kPa:han. Alhaisimmillaan hapen osapaine on kaikkien solujen mitokondrioissa - yleensä lähellä nollaa. Solujen sisäiset happigradientit ovat näin ollen suurimmillaan hengityselinten soluissa ja valtimoveren kanssa tekemisissä olevissa soluissa kuten aortan kaaren reseptorisolut ja eräät munuaisen epiteelisolut, joissa hapen osapaine vaihtelee lähes nollassa lähes ympäristön hapen osapaineeseen. Toisaalta ympäristön happipitoisuuden muutokset vaikuttavat voimakkaimmin näiden solujen happigradientteihin. Pienimmillään solun sisäisen happipitoisuuden vaihtelu on kaukana verisuonituksesta olevissa soluissa.

Hapen osapaineen erot elimistön eri osissa ja jopa saman solun eri osissa mahdollistavat sen, että happi voi säädellä lukuisia solutoimintoja. Toisaalta eräänä ongelmana hapen solutason vaikutusten arvioinnissa on se, että vähähappisuus - hypoksia - määritellään usein hyvin epätarkasti. Usein puhuttaessa hypoksiasta tarkoitetaan itse asiassa jokseenkin hapetonta ympäristöä - anoksiaa (hapen osapaine < 0.2 kPa) - jonka vaikutukset soluihin poikkeavat huomattavasti eläimen normaaleissa elinoloissa esiintyvistä hypoksiasta (jossa hapen osapaine on yleensä yli 1 kPa). Anoksissa oloissa on mahdollista ja jopa todennäköistä, että mitokondrioiden normaali toiminta häiriintyy, minkä seurauksena solujen aineenvaihdunta on normaalista poikkeava muiltakin osin kuin happipitoisuuden suhteen.



## Hapen vaikutukset solukalvon toimintaan

Solukalvon läpi tapahtuva ionikulkeutuminen säätelee niin hermosolujen ärtyvyyttä, solujen tilavuutta kuin solun sisäisen pH:n kautta yleisesti valkuaisaineiden toimintaa soluissa. Useiden ionikuljetusreittien aktiivisuuden on viime vuosina havaittu riippuvan solun kokemasta hapen osapaineesta. Kalojen punasolujen natrium/protonivaihtaja, joka säätelee solun sisäistä pH:ta, aktivoituu alhaisessa hapen osapaineessa, kun taas kalium/kloridi yhteiskuljetus, joka säätelee solun tilavuutta, inhiboituu vähähappisissa oloissa. Natriumin kulkeutuminen nisäkkään keuhkorakkuloiden pintasolujen natriumkanavien kautta puolestaan hidastuu vähähappisissa oloissa samoin kuin kalsiumin kulkeutuminen sileän lihaskudoksen solujen kalsiumkanavien kautta. Esimerkit, joissa on havaittu happipitoisuuden vaikuttavan ionikuljetusreittien toimintaan, ovat lisääntyneet sitä mukaa kun tutkimuksia on tehty. Happiherkkiä ionikuljetusreittejä on kuvattu kaikkien selkärankaisten soluista, mikä viittaa siihen, että niillä on suuri merkitys solun toiminnossa, vaikka useimmissa tapauksissa ionikuljetuksen happiriippuvuuden fysiologista merkitystä ei toistaiseksi tunneta.

Osoituksena ionikuljetuksen happiriippuvuuden tärkeydestä ovat nisäkkäiden aortan kaaren ja karotidikappaleen aistinsolujen kaliumkanavat, joiden toiminta osaltaan säätelee hengitysnopeutta. Hengityksen säätelyä ohjaa aivosillan ja ydinjatkeen alueella oleva hengityskeskus, joka saa viestejä niin aivojen alueelta, hengityselimistä kuin verenkierrosta. Yhtenä tärkeimmistä aistinelimistä ovat aortan kaaren ja päähän menevien karotidivaltimoiden aistinsolurykelmät, joissa on sekä veren hiilidioksidipitoisuutta aistivia soluja. Näiden solujen aistima informaatio hiilidioksidipitoisuuden noususta tai happipitoisuuden laskusta viestitetään hermosolujen välityksellä hengityskeskukseen, jonka antaman hermostollisen käskyn tuloksena hengitys kiihtyy. Viesti happipitoisuuden alenemisesta perustuu siihen, että aortan kaaren ja karotidikappaleen aistinsolujen solukalvon kaliumkanavien toiminta riippuu happipitoisuudesta. Happipitoisuuden alentuessa kaliumkanavien aktiivisuus pienenee (ja positiivisten varauksien kulkeutuminen vähenee), mikä on ensimmäinen vaihe hengityskeskukseen menevän, happipitoisuuden laskusta tiedottavan viestin synnyssä.

## Hapen vaikutukset geenien ilmenemiseen

Jo viitisenkymmentä vuotta sitten oli selvinyt, että hapen saannin vaikeudet kiihdyttivät happea kuljettavien punasolujen muodostusta. Korkean ilmanalan harjoittelusta kehittyikin suhteellisen nopeasti yleisesti käytetty suorituskykyä parantava keino kestävyyslajeissa, joissa hapenkuljetuksen tehokkuus osaltaan määrää menestyksen. Punasolujen muodostumisen kannalta ratkaisevaksi osoittautui se, että vähähappinen ympäristö kiihdytti erytropoietiinin synteesiä. Erytropoietiini on tiettyjen munuaisen solujen tuottama hormoni, joka säätelee punasolujen muodostumista. Mekanismi, jolla alhainen happipitoisuus aiheutti erytropoietiinin tuotantoa, pysyi mysteerinä aina 1990-luvulle asti. Vasta vajaa kymmenen vuotta sitten tehtiin ensimmäiset kokeet, joilla voitiin osoittaa, miten alhainen happipitoisuus vaikuttaa tiettyjen geenien, ensimmäisenä erytropoietinigeeni, ilmenemiseen eli valkuaisainetuotantoon.

Alhaisen happipitoisuuden aiheuttaman geenien ilmenemisen periaatteet on selvitetty pääpiirteissään kuvassa 1. Ratkaisevassa asemassa kaikilla tutkituilla eliöillä näyttää olevan alhaisen happipitoisuuden indusoima transkriptiotekijä. Näistä tärkein on HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), mutta muitakin alhaisen happipitoisuuden indusoimia säätelytekijöitä on nyttemmin kuvattu. Solut muodostavat säätelytekijää jatkuvasti, mutta hyvähappisessa ympäristössä proteiini hajotetaan nopeasti, sen hajoamisen puoliaika (puolet proteiinista hajoaa) on vain 3-5 min. Alhaisen happipitoisuuden vaikutuksesta HIF-1 stabiloituu ja siirtyy solulimasta tumaan, jossa muodostaa dimeerin ARNT-valkuaisaineen kanssa (aryl hydrocarbon nuclear translocator). Dimeeri sitoutuu vähähappisuuden vaikutuksesta aktivoituvan geenin säätelyalueelle, minkä seurauksena geenin transkriptio kiihtyy

ja muodostuvasta lähettiRNA:sta tuotetaan geenin tuotetta, esimerkiksi erytropoietiinihormonia.

Erytropoietiinihormonin tuotannon säätelymekanismiin selvittyä on osoitettu, että samainen HIF-1 säätelee nisäkkäissä ainakin 40 muun geenin toimintaa. Uusia säätelykohteita on tullut esiin sitä mukaa kun hapen vaikutuksia geenisäätelyyn on tutkittu. Yhtenä merkittävimmistä alhaisen happipitoisuuden säätelystä geeneistä on verisuoniston muodostumisesta tärkeän kasvutekijän, VEGF:n (vascular endothelial growth factor), geeni. VEGF:n tuotannon kasvu on välttämätöntä muun muassa syöpäkasvaimen verisuonituksen kehittymiselle. Muodostuva kasvain on yleensä vähähappinen, mikä seurauksena sen solut alkavat tuottaa suuret määrät VEGF:ää ja verisuonitus alkaa syntyä. Suonituksen kehittyminen on välttämätöntä sekä kasvaimen koon suurenemiselle että etäispesäkkeiden muodostukselle, koska vain verisuonistoon päässeet syöpäsolut voivat levitä alkuperäisen sijaintipaikkansa ulkopuolelle.


Vaikka peruseriaatteen alhaisen happipitoisuuden vaikutuksista geenisäätelyyn onkin selvitetty, lukuisat kysymykset odottavat vielä ratkaisuaan. Toistaiseksi tiedetään hyvin huonosti, mikä hapen osapaine on "alhainen happipitoisuus" ja kuinka paljon "alhainen happipitoisuus" vaihtelee eläimestä, solutyypistä ja solun aikaisemmin kokemasta ympäristöstä riippuen. Tutkituissa nisäkkäissoluissa HIF-1:n kertyminen oli suurimmillaan 0.5-1 kPa:n hapen osapaineessa, mikä viittaisi siihen, että happipitoisuudesta riippuva geenisäätely olisi vain hyvin alhaisessa happipitoisuudessa tärkeää. Toisaalta lohikalojen soluissa HIF-1:n määrä on korkeimmillaan jo 5 kPa:n hapen osapaineessa. Tämä hapen osapaine on laskimoveren hapen osapaine hyvähappisissa olosuhteissa, mikä viittaa siihen, että hapesta riippuva geenisäätely on osa eläinten normaalia geenisäätelyä myös hyvähappisissa olosuhteissa. Joka tapauksessa HIF-1 on välttämätöntä normaalille yksilönkehitykselle: HIF-1:n puuttuessa nisäkäseläin ei kehity normaalisti, vaan mm. sen verenkierron, sydämen kehityksessä ja hermostoputken kehityksessä on vakavia häiriöitä, mitkä johtavat siihen, että kehitys lakkaa kokonaan suhteellisen varhain (mm. hermostoputki ei koskaan sulkeudu).

### Happipitoisuus vaikuttaa tärkeimpiin solun sisäisiin viestintäreitteihin


Solujen toiminnan säätely perustuu osaltaan solun sisäiseen viestintään. Esimerkiksi hormonien sitoutuminen solukalvon reseptoreihin aiheuttaa solun sisäisten viestintämolekyylien pitoisuuksien muutoksia. Viestintämolekyylit puolestaan säätelivät mm. solun entsyymeinä toimivien valkuaisaineiden fosforilaatioastetta ja tätä kautta solun aineenvaihduntaa. Tärkeitä solun sisäisiä viestintämolekyylejä ovat mm. syklistet nukleotidimonofosfaatit (cAMP ja cGMP), inositoli trisfosfaatti (IP<sub>3</sub>) ja diasyyloglyseroli (DAG) sekä typpioksidi (NO). Viime vuosina on osoittautunut, että happipitoisuus vaikuttaa kaikkien näiden molekyylien kertymiseen. Esimerkkeinä ovat mm. se, että alhainen happipitoisuus kiihdyttää typpioksidisyntetaasientsyymin muodostumista ja että karpin punasoluissa muodostuu vähähappisissa oloissa paljon enemmän cAMP:tä adrenergisen stimulaation seurauksena kuin hyvähappisissa olosuhteissa. Toistaiseksi tiedetään hyvin vähän siitä, mikä merkitys havaituilla viestintämolekyylien pitoisuuksien happiriippuvuudella on elintoimintojen kannalta.

### Miten solut aistivat happea ?


Vaikka happipitoisuuden on havaittu vaikuttavan niin solukalvon toimintaan, geenisäätelyyn kuin solun sisäisten viestintämolekyylien kertymiseen, tunnetaan hapen aistimisen mekanismi toistaiseksi sängen huonosti. Todennäköistä on, että happea aistivat molekyylit soluissa ovat useasta alayksiköstä koostuvia hemiproteiineja. Hemiproteiinit voisivat toimia hemoglobiinin tavoin happea sitoen ja luovuttaen samalla kun niiden avaruus rakenne (konformaatio) hapen sitoutuessa ja irrotessa muuttuu. Koska ehdot täyttäviä hemiproteiineja on soluissa kymmeniä - jopa satoja - erilaisia, on hyvinkin mahdollista, että soluissa on useita eri happea



aistivia molekyyliä. Nämä molekyylit voisivat olla lähellä vaikutuskohdettaan - kalvoproteiineja silloin kun vaikutus kohdistuu ensi sijaisesti ionikuljetukseen tai sytoplasmisia, jos vaikutus on geenisäätelyyn. Eräs hemiproteiini, joka näyttää osallistuvan hapen aistimiseen karotidikappaleessa on solukalvon sytokromi b<sub>558</sub>, joka reagoi hapen kanssa muodostaen vetyperoksidiä. Muodostunut vetyperoksidi puolestaan vaikuttaa karotidikappaleen kaliumkanavan aktiivisuuteen. On myös esitetty, että hapen aistiminen tapahtuisi mitokondrioiden valkuaisaineissa. Tämä on kuitenkin epätodennäköistä, koska mitokondrian toiminnan estävät myrkyt eivät vaikuta erytropoietiiniin tai VEGF:n kiihtyvään synteisiin vähähappisessa ympäristössä ja koska hapesta riippuvaa kalvokulkeutumista esiintyy nisäkäsplasoluissa, joilta mitokondriot kokonaan puuttuvat. Lisäksi mitokondrioiden hapen osapaine on liian alhainen ja riippuu liian paljon aineenvaihdunnan energiantarpeesta, jotta se voisi selittää esim. solukalvon ioniläpäisevyyksien riippuvuutta hapen osapaineesta.




Hapen vaikutusten välittyminen kohdemolekyyliin solun sisällä näyttää perustuvan reaktiivisten happimuotojen - vapaiden radikaalien - pitoisuuden muutoksiin hapen osapaineen funktiona. Vetyperoksidin pitoisuuden muutokset vaikuttavat niin karotidikappaleen kaliumkanavan kuin punasolukalvon kalium-kloridiyhteiskuljetusreitin aktiivisuuteen. Erytropoietiini tuotanto kiihtyy vetyperoksidipitoisuuden laskiessa. Lisäksi solujen reaktiivisten happimuotojen pitoisuus nousee happipitoisuuden noustessa eläinten normaalisti kokemalla hapen osapainealueella (1-20 kPa). Viimeaikaiset kokeemme reaktiivisten happimuotojen merkityksestä hapesta riippuvan kalium-kloridi yhteiskuljetuksen säätelyssä viittaavat siihen, että erityisesti lyhytikäinen hydroksyyli radikaali säätelisi kuljetusaktiivisuutta. Koska hydroksyyli radikaalin ikä on vain mikrosekunnin murto-osia, sen käyttö hapesta riippuvien solutoimintojen säätelyssä mahdollistaisi säätelyn paikallisesti eri osissa solua.




Happiradikaalit näyttävät täten olevan tärkeitä normaalissa solun sisäisessä viestinnässä. Tästä syystä on ilmeistä, että kaikki sellaiset ympäristömuutokset, jotka vaikuttavat vapaiden radikaalien muodostumiseen, olivat ne sitten helposti hapettuvien tai pelkistyvien metalli-ionien pitoisuuden nousu tai ultraviolettivalon lisääntyminen, voivat häiritä solutoimintoja solun sisäiseen viestintään vaikuttaen ennen kuin aiheuttavat rakenteellisia vaurioita. Osoituksena tästä on hapesta riippuvan kalium-kloridiyhteiskuljetuksen raju kiihtyminen, kun soluja tasapainotettiin kuparisulfaattia sisältävässä liuoksessa.



### Happi ohjatun solukuoleman säätelyssä




Ohjattua solukuolemaa saattavat aiheuttaa niin korkeat hapen osapaineet, jotka lisäävät reaktiivisten happimuotojen määrää solussa, kuin alhainen happipitoisuuskin. Mitokondrioilla saattaa olla huomattava merkitys hapesta riippuvan ohjatun solukuoleman säätelyssä, koska toisaalta on havaittu, että mitokondrioiden sytokromi c vapautuu solulimaan alhaisissa happipitoisuuksissa ja toisaalta on myös havaittu, että sytokromi c:n vapautuminen sellaisenaan näyttää aiheuttavan apoptoosia. Ohjattu solukuolema on tärkeä tekijä yksilönkehityksessä osaltaan säädellen niin elimistön ulokkeiden kuin invaginaatioiden muodostumista.




Viimeaikaisten tulosten perusteella näyttää siltä, että nimenomaan alhaisen hapen osapaineen aiheuttama ohjattu solukuolema on välttämätöntä alkioiden normaalin rakenteellisen kehityksen kannalta. Kun rotan alkioita kasvatettiin normaaliin ilmakehään verrattuna kaksinkertaisessa happipitoisuudessa, jossa solukuolema estyi, niillä oli merkittäviä rakenteellisia vaurioita - esimerkiksi hermostoputki ei sulkeutunut kunnolla - verrattuna tavallisiin tai vähähappisessa ympäristössä kasvatettuihin rotan alkioihin.



### Paljon vielä tutkittavaa




Edellä on kuvattu joukko solutoimintoja, jotka ovat hapesta riippuvia, mutta ainakin nykyhetken tietämyksen perusteella



mitokondrioissa tapahtuvasta energiatuotannosta riippumattomia. Esitettyjen esimerkkien lisäksi hapestä riippuvia solutoimintoja paljastuu sitä mukaa, kun solutoimintojen tutkimukseen liitetään yhtenä muuttujana hapen osapaine. Useissa tapauksissa happipitoisuuden vaikutuksilla on suora kytkentä siihen, että muutoksien ansiosta hapen kuljetus ympäristöstä mitokondrioihin tehostuu. Näin on laita esimerkiksi silloin, kun punasolujen tuotanto ja verisuoniston muodostuminen kiihtyy vähähappisessa ympäristössä. Useat muutokset puolestaan auttavat eläintä tuottamaan energiaa tehokkaasti alhaisessa happipitoisuudessa - tähän suuntaan vaikuttavat niin solukalvon glukoosiläpäisevyyden kasvu kuin glykolyysin entsyymien aktiivisuuden kasvu vähähappisuuden vaikutuksesta. On kuitenkin koko joukko toimintoja, joiden happiriippuvuuden merkitystä ei vielä tiedetä - näiden ilmiöiden selvittämisessä riittää haastetta niin kehitysbiologeille kuin fysiologeille.




#### **KIRJALLISUUTTA**



Acker, H. (1994) Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respiration Physiology* 95, 1-10.


Bunn, H. F., R. O.Poyton (1996): Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological Reviews* 76, 839-885.

Gassmann, M., R. H.Wenger (1997): HIF-1, a mediator of the molecular response to hypoxia. *News in Physiological Sciences* 12, 214-218.



Semenza, G. L. (1999): Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* 15, 551-578.

Gibson, J. S., A. R. Cossins, J. C. Ellory (2000): Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells. *Journal of Experimental Biology* 203, 1395-1407



*Kirjoittaja toimii professorina Turun yliopiston biologian laitoksella. Kirjoitus perustuu esitelmään Suomalaisen Tiedeakatemian kokouksessa 9.10.2000.*

