

Brooks GA, Brooks TG, Brooks S

Laktat als metabolisches Signal der Genexpression

Lactate as a Metabolic Signal of Gene Expression

Exercise Physiology Laboratory, Department of Integrative Biology, University of California, Berkeley, CA USA

ZUSAMMENFASSUNG

Es gibt drei Hauptfunktionen von Laktat. Im Allgemeinen dient Laktat der Energieversorgung des Körpers und als glukoneogenetischer Vorläufer. Auf Zellebene ist Laktat ein Signalmolekül, ein „Lactormon“. Laktat und andere Monocarboxylate durchdringen Zellmembranen mit Hilfe von Monocarboxylat-Transportproteinen (MCT). MCT1 ist die wichtigste MCT1-Isoform, die sich im roten Skelettmuskel befindet, vor allem in den sarkolemmalen, mitochondrialen und peroxisomalen Membranen. Die Isoform MCT4 ist im Sarkolemm der schnellen (fast twitch) FT-Fasern vorhanden. Durch Ausdauersport erhöht sich der MCT1-Gehalt in den sarkolemmalen und mitochondrialen Membranen, jedoch nicht der MCT4-Gehalt. Die MCT1 Proteinexpression geschieht während der Transkriptionsphase und ist damit Teil eines ausgedehnten, für Radikale sensitiven Signalnetzwerks, wo Transkriptome die Biogenese von Muskelmitochondrien und andere Anpassungen während Training regulieren. Doch Laktatproduktion ist mehr als nur eine Reaktion auf Stress, genauer genommen ist sie Teil eines Belastungs-Beanspruchungs-Mechanismus, der während der Muskelkontraktion in Gang gesetzt wird. Um die ATP-Homöostase zu erhalten, wird die Glykolyse aktiviert und die Produktion und Ansammlung von Laktat angeregt. Im Gegenzug bewirkt die vorübergehende Erhöhung von Laktat und der Verbrauch von O₂ in den Mitochondrien die Bildung von Radikalen, welche wiederum ein transkriptionales Netzwerk aktivieren, das adaptive Zellreaktionen signalisiert.

Schlüsselwörter: Laktat-Shuttle, Energieversorgung, glukoneogenetischer Vorläufer, Signalmolekül, Sauerstoffradikale (ROS), Muskelarbeit, Biogenese von Muskelmitochondrien, Monocarboxylat-Transportproteine (MCT)

EINLEITUNG

Das den Autoren aufgegebene Thema ist von äußerster Aktualität. In der Forschung über Laktat hat sich vieles vor allem durch neue Techniken geändert. Daher sind die in letzter Zeit gewonnenen Befunde von großem Interesse für die Sportmedizin.

Einstein bemerkte in Bezug auf Heisenbergs Unbestimmtheitsrelation, dass Gott nichts dem Zufall überlässt, als er sagte: „Gott würfelt nicht“. Wir möchten diesen Satz zum Anlass nehmen, um die Frage zu stellen, warum Laktat wichtig ist für den Körper, wenn es doch angeblich ein Gift ist, das ermüdend wirkt. Oder, warum produziert der Körper Laktat gerade dann, wenn er unter Belastung steht? Unserer Erkenntnis nach ist Laktat von hoher Bedeutung als ein Zwischenprodukt des Stoffwechsels und als Signalmolekül. Um neue Erkenntnisse über die Reaktionen im Körper unter Belastungszunahme und den Stoffwechsel zu gewinnen, ist es nötig, die Regulierungsfaktoren der Produktion und des Abbaus von Laktat zu verstehen.

SUMMARY

There are three key attributes of lactate function: at the whole body level, lactate is a fuel energy source and a gluconeogenic precursor. At the cellular level, lactate is a signaling molecule, a “lactormone.” Lactate and other monocarboxylates permeate membranes of cells by means of transport proteins, termed MCTs. MCT1 is the major MCT1 isoform expressed in red skeletal muscle in which it is present in the sarcolemmal, mitochondrial and peroxisomal membranes. MCT4 is highly expressed in the sarcolemmal membranes of fast-twitch (FT) muscle fibers. Endurance training increases muscle sarcolemmal and mitochondrial MCT1, but not MCT 4 expression. MCT1 protein expression appears to be regulated at the level of transcription being part of a vast oxygen radical-sensitive signaling network, a “transcriptome”, that regulates muscle mitochondrial biogenesis and many other adaptations known to occur in response to exercise training. Rather than purely a stress response, a more appropriate view may be that lactate production is part of a stress-strain mechanism during muscle contraction. The stress to maintain ATP homeostasis activates glycolysis and lactate production and accumulation. In turn, the transient rises in [lactate] and mitochondrial O₂ consumption induces oxygen radical generation, which activates a transcriptional network signaling adaptive cell responses.

Key words: lactate shuttle, energy source, gluconeogenic precursor, signaling molecule, reactive oxygen species (ROS), physical exercise, mitochondrial biogenesis, monocarboxylate transport protein (MCT)

Aus unseren Laboruntersuchungen können wir drei Hauptfunktionen von Laktat ableiten: Laktat dient als Energiequelle, als glukoneogenetischer Vorläufer und als Signalmolekül. Bezogen auf die ersten beiden Funktionen hilft Laktatproduktion und -abbau dem Körper, sich für eine kurze Zeit an Belastungssituationen anzupassen. Die dritte Funktion ermöglicht eine langzeitige Anpassung an strukturelle und stoffwechselbezogene Veränderungen während Belastung. Sowohl Zell-zu-Zell wie auch intrazelluläre Laktat-Shuttle sind an der Anpassung an Arbeit und andere Belastungen beteiligt.

Laktat als Verbindung von glykolytischem und oxidativem Stoffwechsel: Durch Untersuchungen mit Isotopmarkierung (22, 27), Studien arterio-venöser Unterschiede in den Muskelgefäßen (9) und deren Kombination (2, 6, 27) konnten wir erkennen, dass der Körper Laktat fortlaufend produziert, selbst im Ruhezustand. Natürlich erhöhen sich Laktatproduktion und -abbau wesentlich während körperlicher Betätigung. Außerdem kamen wir zu der Erkenntnis, dass Muskelgewebe Laktat oxidativ gleichzeitig produzieren wie

auch abbauen kann (2,6,27). Der Vorgang der Laktatproduktion in den Muskeln unter ausschließlich aeroben Bedingungen wurde von anderen bestätigt (26). Aufgrund der Energetik des terminalen Enzyms der Reaktionskette im Cytosol, Laktatdehydrogenase, ist Laktat die unvermeidliche Folge von Glykogenolyse und Glykolyse, wobei Laktat auch ein Substrat für die mitochondrial-oxidative Phosphorylierung ist (4,7). Folglich ist die Umwandlung von Zell- und Gewebelaktat außerordentlich wichtig für die Muskelenergetik, weil sie den glykolytischen und den aeroben Stoffwechsel miteinander verbindet.

Laktat als glukoneogenetischer Vorläufer: Oxidation verbraucht nicht unmittelbar die gesamte Menge des im Muskel erzeugten Laktats; sondern Laktat wird, jedenfalls anfänglich, vom arbeitenden Muskel in den systemischen Kreislauf weitergeleitet (2,5). Dieser Vorgang ist von Vorteil, weil der arbeitende Muskel damit das Herz versorgt (17) und weil Laktat als glukoneogenetischer Vorläufer fungiert. Wir haben mit Hilfe von verschiedenen Methoden wie zum Beispiel der dualen Isotopenmarkierung unter Einbeziehung von Kombinationen von D2- und ¹³C-markierter Glukose (15) und der Markierung von Glukose aus infundiertem ¹³C-Laktat (1) die Glukoneogenese während körperlicher Belastung untersucht. Außerdem basieren unsere neuesten Untersuchungen auf der von uns entwickelten Technik der Laktatklemme. Dieses Verfahren kombiniert exogenes Laktat und Isotopmarkierungssubstanz (24). Des Weiteren verglichen wir die Glukoneogenese aus Laktat mit der aus anderen Präkursoren, zum Beispiel Glycerin (28), wobei die dominierende Rolle von Laktat nachgewiesen werden konnte, und zwar nicht nur während körperlicher Belastung (12).

Mit der Entwicklung von verbesserten Techniken konnten neue Ergebnisse erzielt werden, die auf den bereits etablierten Erkenntnissen basieren. Zum Beispiel war seit längerer Zeit bekannt, dass Training den Laktat Spiegel im Blut senkt, gemessen bei gleicher absoluter und relativer Intensität. In Abbildung 1 sind die arteriellen Laktatlevel von neun Männern im Ruhezustand und während körperlicher Belastung abgebildet. Dass Laktat fortwährend produziert wird, sowohl im Ruhezustand als auch im Belastungszustand, wird in Abbildung 2 ersichtlich. Der klassische Effekt der Verminderung des arteriellen Laktats während körperlicher Belastung bei einer gegebenen absoluten Leistung nach Training (Abb. 1) erklärt sich als Folge einer Erhöhung der Laktat-clearance (Abb. 2c) durch Zunahme der Mitochondriendichte im Muskel (12,13) und damit verbessertem oxidativen Stoffwechsel (Abb. 3).

Laktat als Signalmolekül (Lactormon): Laktat ist stärker reduziert als seine komplementäre Ketoverbindung Pyruvat. Deswegen ändert sich das zelluläre Redox-Gleichgewicht, wenn Laktat zu Pyruvat oxidiert oder durch Pyruvat ersetzt wird. Beispiele eines solchen Austauschs sind belegt zwischen Cytosol und Mitochondrien (4,7), Peroxisomen und Cytosol (23), arbeitenden Muskeln und Herz (17), Muskeln und Leber (1) sowie zwischen Blut und Muskel (6,9). Deshalb stellt die Produktion von Laktat in einem Zellkompartiment und sein Abbau in einem anderen, seien sie benachbart oder voneinander entfernt, einen wichtigen Signalmechanismus dar, weil Redoxveränderungen auf millimolarer Ebene vor sich gehen, im Gegensatz zur mikro- oder nanomolaren Ebene.

Die vorher genannten Funktionen von Laktat sind bereits bekannt (3,8), deswegen soll hier nun beschrieben werden, was für neue Erkenntnisse über langfristige Muskelanpassungen in Reaktion auf Laktat gewonnen werden konnten.

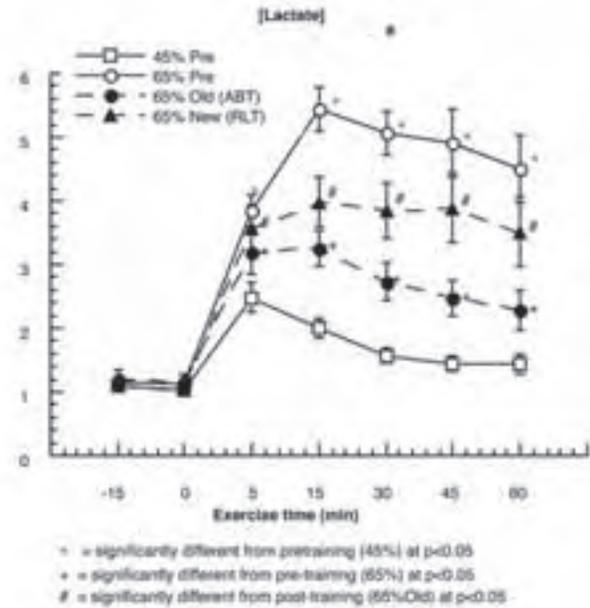


Abbildung 1: Arterielle Laktatkonzentration während Ruhezustand und Muskelarbeit, vor (Pre-) und nach 9-wöchigem Ausdauertraining. Symbole: Pre, Pre-Training; ABT, Absolute Leistung [65% des "alten" Pre-Training-Höchstwertes des Sauerstoffverbrauchs (VO₂peak)]; RLT, Relative Leistung (65% der "neuen" Post-Training VO₂peak), Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für 8-9 Testpersonen. Entnommen aus 1 und 2. Mit Erlaubnis der American Physiological Society.

Laktat als metabolisches Signal der Genexpression: Wir möchten hier über unsere neuesten Ergebnisse mit gezüchteten L6-Muskelzellen von Ratten berichten. Zwar sind die Resultate neuartig und von Interesse, doch leider auch die am wenigsten überprüften, da sie noch nicht an menschlichen Zellen in vivo getestet worden sind. Zurzeit können wir aber die folgenden Ergebnisse vorlegen, die wir bei unserer Suche nach physiologischen Signalen, welche die Monocarboxylattransporter-Expression regulieren, gewonnen haben. MCT-Isoformen (z.B. MCT1) gehören zu einer Gen-Superfamilie von Transportern, die organische Anionen zusammen mit H⁺ durch Membranen passieren lassen. Das erste nachgewiesene Protein wurde von seinen Entdeckern MCT1 genannt (16). Die ersten vier Isoformen aus dieser Superfamilie sind Laktat- und Pyruvat Transporter, wobei MCT1 (alias SLC16A1) am häufigsten vorhanden ist. MCT1 wird in verschiedenen Zellen und Geweben von Neuronen (19) bis zu Erythrozyten und Spermien exprimiert (25). Außerdem wird MCT1 in verschiedenen Zelldomänen exprimiert, in den Muskeln sind dies Membranen im Sarkolemm (16) sowie den Mitochondrien (7) und Peroxisomen (23). Aufgrund unseres überwiegenden Interesses, den Muskellaktat-Stoffwechsel zu verstehen, haben wir uns schwerpunktmäßig mit der Regulierung von MCT1-Expression beschäftigt.

Traditionell wird die Kultivierung von Zellen durch Inkubation in hochkonzentriertem Glukose-Nährmedium unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Grundlegende Techniken sind in diesem Bereich seit fast einem Jahrhundert in Gebrauch. Unsere anfänglichen Studien mit L6-Zellen ergaben überraschende Wirkungen der oben genannten vermuteten physiologischen Signale der MCT1-Expression (z.B. H₂O₂, Laktat, H⁺, Ca⁺⁺), bis wir dann unser Zellsystem verstanden und unserer Hypothese, dass Laktat ein physiologisches Signal darstellt, glauben konnten. Nachdem wir den

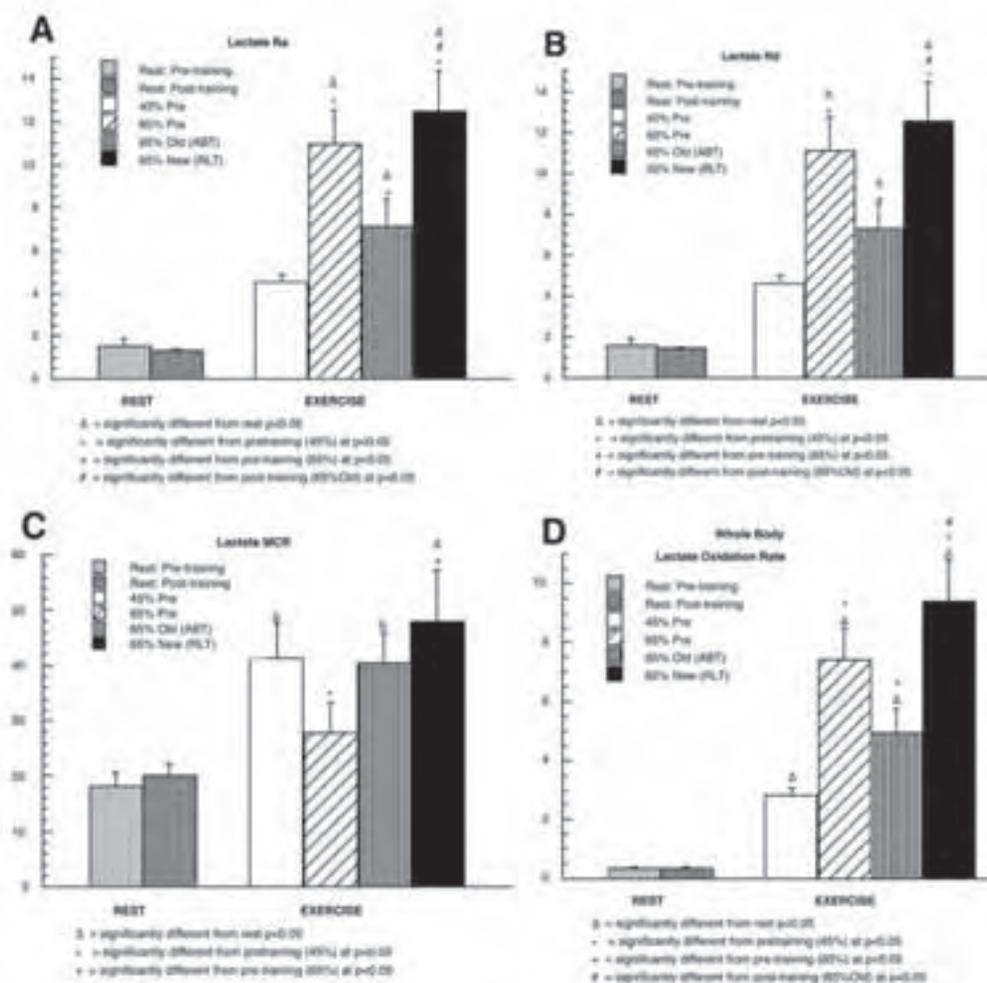


Abbildung 2: Die Effekte der Trainingsintensität und des Trainings auf die Parameter der Kinetik des Blutlaktats wurden mittels primed-continuous Infusion von [3-13C] Laktat gemessen: (A) Rate der Laktataufnahme in das Blut (Ra); (B) Rate der Laktatabgabe aus dem Blut (Rd); (C) Metabolische Abbaurrate (Metabolic Clearance Rate - MCR = $Rd/[Laktat]$) und (D) Oxidationsrate. Die Werte für Ra, Rd und MCR wurden durch Isotopenverdünnung in arteriellem Blut gemessen und die Werte für Oxidation wurden anhand von Isotopenanreicherung von CO_2 und totaler CO_2 -Produktion bestimmt. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM für 8-9 Testpersonen dar. Entnommen aus 2. Mit Erlaubnis der American Physiological Society.

Warburg-Effekt (Laktat-Produktion unter aeroben Bedingungen) bedachten, konnten wir verstehen, dass L6-Myozyten rasch glykolytisch und somit Laktat fortwährend produzieren. Unter der Annahme, dass Laktat ein physiologisches Signal sei, würde Laktat fortwährend von Zellen in konzentriertem Glukose-Nährmedium produziert und die Expression von MCT1 würde sich somit entsprechend erhöhen. Laktatproduktion unter vollständig aeroben Bedingungen und steigende MCT1-Proteinlevel waren tatsächlich Merkmale unserer anfänglichen Studien. Abbildung 4 zeigt einige Resultate bei Experimenten, in denen wir versuchten, das konzentrierte Glukose-Nährmedium mit verschiedenen Methoden zu kontrollieren. Im Falle von 10 mM und 20 mM wurde exogenes Laktat hinzugefügt (20). Bei 0 mM Laktat wurde das Glukose-Nährmedium zweimal täglich gewechselt. Für das Background Treatment wurde kein Laktat zugefügt und auch das Nährmedium nicht gewechselt; nach 48 Stunden lag der Laktatwert nahezu bei 10 mM, also so hoch wie intensiver Muskelarbeit. Wir fanden heraus, dass es nötig ist, die Inkubation zu kontrollieren, da eine Veränderung des Laktats auch eine Veränderung des MCT1-Proteinlevels auslöst.

Nachdem wir das Problem des Nulllinien-Drift bei der MCT1-Expression, das durch endogene Laktatproduktion hervorgerufen wird, erkannt hatten, konnten wir systematische Veränderungen der MCT1 mRNA und der Proteinlevel in Reaktion auf Laktat feststellen (Abb. 5). Die Daten in Abbildung 5 können als Hinweis auf eine Regulierung der Beziehung zwischen Laktat und MCT1-Expression auf der Transkriptionsebene bewertet werden (20).

Die Signalwirkung des Laktats in gezüchteten L6-Zellen könnte mit der Bildung von Sauerstoffradikalen (Reactive Oxygen Species ROS) zusammenhängen. Dieser Verdacht wurde durch Studien über die Rolle von Laktat bei der Wundheilung hervorgerufen (11) und verstärkte sich nach unseren Analysen der MCT1-Genpromotorregion: Es gab Hinweise auf potentielle Bindungsstellen für bekannte ROS-reaktive Transkriptionsfaktoren (20) wie cAMP-reaktives, elementbindendes Protein (CREB), nuklearer Faktor kappaB (NF-kB), aktiviertes Protein A (AP-1), stimulierendes Protein 1 (SP-1) und nuklearer Faktor Erythroid 2 (NF-E2, or Neff).

Um die Idee, dass Laktat als ROS-Generator wirkt, zu bestätigen, haben wir die Wasserstoffperoxid-Produktion in mit 20 mM Laktat behandelten L6-Zellen getestet. Sowohl hohe Glukosekonzentration wie Laktat erhöhen die Peroxidproduktion (20). Unsere Resultate, dass hohe Glukosekonzentrationen die ROS-Produktion in Zellen beeinflusst, stimmen mit denen anderer überein (30). Dabei sind unsere Resultate jedoch neuartig, da sie den Effekt von Laktat als ROS-Generator in gezüchteten Myozyten beschreiben.

Um zu untersuchen, ob erhöhte MCT1-Expression in L6-Zellen nach Laktatinkubation die Aktivierung von ROS-sensitiven Transkriptionsfaktoren einschließt, erfassten wir die DNA-Bindung unter Benutzung von electrophoretic mobility shift assay (EMSA) mit 20 mM Laktatbehandlung in einem Zeitraum von 10 Minuten bis 24 Stunden. Wir stellten erhöhte NF-kB-DNA-Bindung nach 10 Minuten bis zu 3 Stunden fest. Des Weiteren erhöhte Laktatinkubation die NF-E2-DNA-Bindungsaktivität, während keine Verände-

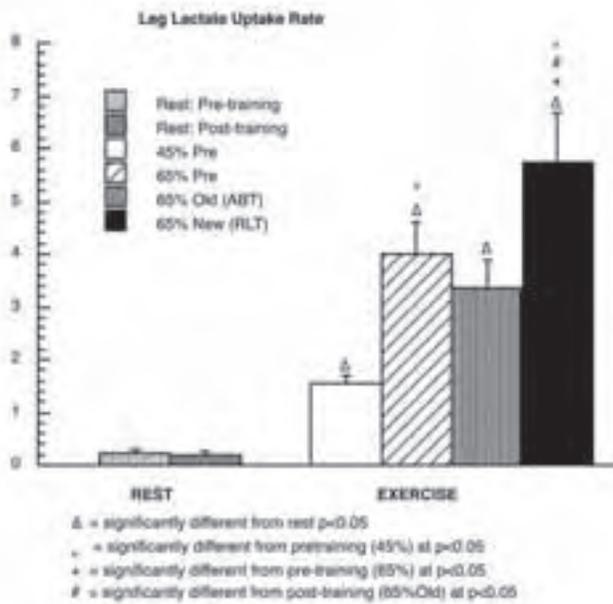


Abbildung 3: Durch Tracer gemessene Laktataufnahme des Beins (das im Wesentlichen aus Muskeln besteht) während Ruhe und Arbeit, jeweils vor und nach Training. Der Tracer war [3-13C]Laktat. Mittelwerte \pm SEM für 7-9 Testpersonen. Entnommen aus Bergman et al. 1999b. Mit Erlaubnis der American Physiological Society.

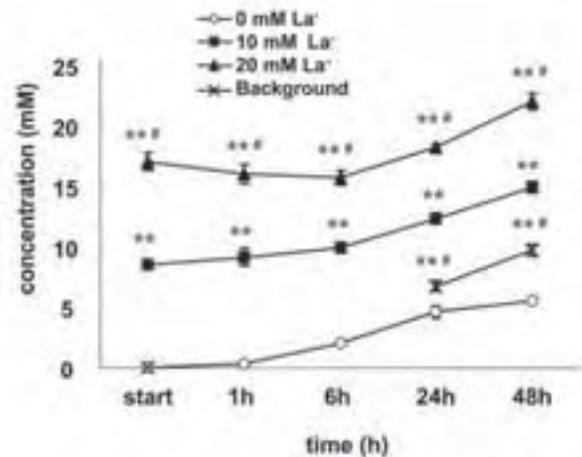


Abbildung 4: Änderungen der Laktatkonzentration (La-) im Inkubationsmedium von gezüchteten L6-Myozyten der Ratte: 0, 10 und 20 mM La-Gruppen und eine Background-Gruppe, $n \geq 6$ Petrischalen. Die '0' - und 'Background'-Gruppen unterscheiden sich durch das zweimal tägliche Wechseln des Mediums in der '0' Gruppe, das eine höhere Glukosekonzentration im Vergleich zur 10 mM-Laktatgruppe bei 24 h ($p < 0.05$) und zur 20 mM-Laktatgruppe bei 48 h ($p < 0.05$) bewirkte, während sich endogen produziertes Laktat sich in der 'Background'-Gruppe ansammelte. *Signifikant unterschiedlich zur 0 mM-Laktatgruppe für die angegebene Zeit, $p < 0.05$. ** Signifikant unterschiedlich zur 0 mM-Laktatgruppe für die angegebene Zeit, $p < 0.01$. # Signifikant unterschiedlich zur 10 mM-Laktatgruppe für die angegebene Zeit, $p < 0.01$. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Entnommen aus (20). Mit Erlaubnis amerikanischen Gesellschaften für Experimentelle Biologie.

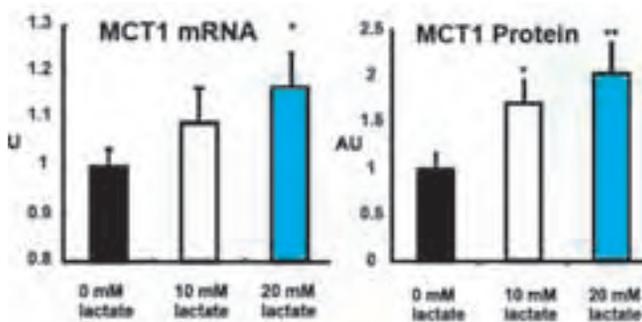
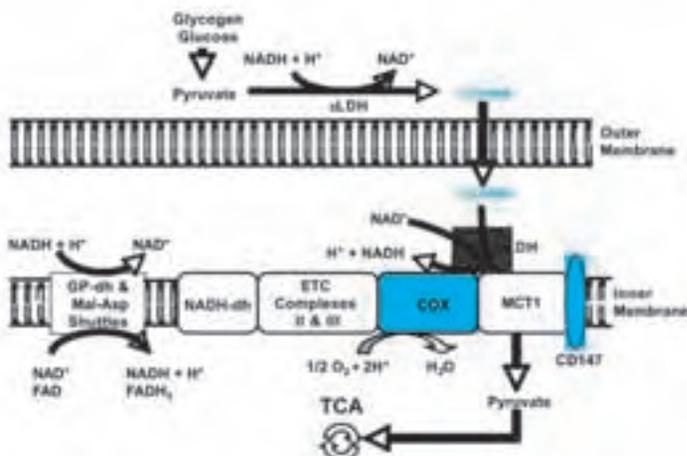


Abbildung 5: MCT1-Messenger-Ribonucleinsäure (mRNA) und Proteinlevel (jeweils willkürliche Einheiten AU) in L6-Zellen nach 1 h Inkubation für die angegebenen Laktatkonzentrationen. Eine gute Korrelation zwischen Message und Proteinlevel wird deutlich. Entnommen aus (20). Mit Erlaubnis der amerikanischen Gesellschaften für Experimentelle Biologie.



rungen in den Bindungsaktivitäten von AP-1 und SP-1 festzustellen waren. Folglich ergab sich, dass NF- κ B- und NF-E2-DNA-Bindung auf laktatinduzierte oxidative Belastung reagieren.

Da Laktatinkubation MCT1 erhöhte (Abb.5) und weil das terminale Elektronentransportkettenelement Cytochrom-Oxidase (COX) ebenso wie Laktat-Dehydrogenase (LDH) und MCT1 wahrscheinlich einen mitochondrialen Laktatoxidationskomplex (LOX) darstellen (Abb.6) (18), haben wir die Wirkung von 20 mM Laktatinkubation auf die Proteinspiegel von COX und von peroxisomproliferatoraktiviertem Rezeptor Gamma Coaktivator-1 Alpha (PGC1 α) gemessen. PGC1 α ist von Interesse, weil es als Hauptkoordinator der mitochondrialen Biogenese gilt (29). Übereinstimmend mit der vermuteten Rolle von PGC1 α beobachteten wir erhöhte PGC1 α mRNA und Proteinlevel in L6-Zellen nach der Inkubation in 20 mM (20). Außerdem erhöhte die Laktatinduktion COX mRNA- und Proteinlevel in L6-Zellen (Abb. 7).

PGC1 α reagiert in seiner Rolle als Hauptkoordinator der mitochondrialen Biogenese mit Transkriptionsfaktoren für mitochondriale Genexpression, einschließlich der für COX, z.B. CREB, nukleärer Respirationsfaktor-1 (NRF-1) und NRF-2 (Moyes & LeMoine 2005). Dementsprechend haben wir den Effekt von L6-Zelleninkubation auf NRF-1-, NRF-2- und CREB-Bindung an DNA gemessen. Die Laktatinkubation beeinflusste die DNA-Bindung von NRF-1 nicht, dagegen erhöhten sich die Bindungsaktivitäten für NRF-2 nach 1 Stunde Inkubation in 20 mM Laktat und die CREB-Bindung nach 30 Minuten (Abb.8) (20). Insgesamt können diese Ergebnisse

Abbildung 6: Illustration des mitochondrialen Laktatoxidationskomplexes (LOC), der für die Sauerstoffsenske sorgt, durch die der intrazelluläre Laktat Shuttle funktioniert. Bestandteile von LOC sind MCT1, sein Gerüstprotein CD147, Laktatdehydrogenase (LDH) und Cytochrom-Oxidase (COX). Entnommen aus (18). Mit Erlaubnis der American Physiological Society.

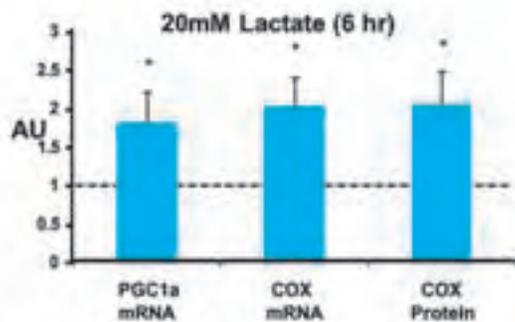


Abbildung 7: PGC1 α -mRNA-, COX-mRNA-, und COX-Proteinexpression in L6-Zellen, die für 6 h mit 20 mM Laktat inkubiert wurden. Die Angaben sind Mittelwerte \pm SEM, wobei die Werte in willkürlichen Einheiten ausgedrückt sind (1 = Mittelwert mRNA oder Proteinexpression in der 0 mM-Laktatkontrolgruppe). PGC1 α - und COX-mRNA-Expression wurden durch Real time quantitative PCR ermittelt. * $P < 0.05$ gegen 0 mM Laktatkontrolle. Entnommen aus (20). Mit Erlaubnis der amerikanischen Gesellschaften für Experimentelle Biologie. Mit Erlaubnis der American Physiological Society.

folgendermaßen bewertet werden: Laktat erhöht sowohl MCT1-Expression wie mitochondriale Biogenese, letztere durch die Bindung von NRF-2 und CREB mit DNA.

Als Sportphysiologen interessieren uns die Zusammenhänge zwischen glykolytischem und oxidativem Stoffwechsel im menschlichen Körper. Nach diesen aufregenden Studien mit modernen molekularen und biochemischen Techniken suchten wir nach Möglichkeiten, Untersuchungen auf höheren Ebenen und an komplexeren Strukturen physiologischer Organisation durchzuführen. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie versuchten wir, das mitochondriale Retikulum und die Proteinkomponenten des mitochondrialen Laktatoxidationskomplexes in gezüchteten Myozyten und Dünnschnitten des erwachsenen Skelettmuskels sichtbar zu machen. Durch die Kombinationen von primären und fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern plus MitoTracker Red und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie mit zwei Wellenlängen wurde die Kolokalisierung von MCT1, COX und LDH in den Mitochondrien ersichtlich (Abb.9). Diese Resultate wurden bestätigt durch zwei unabhängige Methoden: Immunokoprezipitation und Western Blotting von isolierten Zellfraktionen (18). Bis jetzt wurden MCT1 und andere LOX-Proteine benutzt, um die mitochondriale Dynamik darzustellen (18,21). Zurzeit sind Untersuchungen in Arbeit, die Aufschluss über die Effekte physiologischer Signale auf die Expression der vier GTPasen (Mfn1, Mfn2, OPA1, Drp1) und von Fis1 geben könnten.

Gegen die Befürchtung, dass sich Befunde an immortalisierten Zelllinien (Abb.9) schlecht übertragen lassen, sprechen ähnliche Ergebnisse am *M. plantaris* erwachsener Ratten, einem Skelettmuskel mit Typ I und Typ II Fasern (Abb.10) (21). Mit den gleichen Messverfahren zeigte sich eine Kolokalisierung von MCT1 und COX an der Oberfläche des Sarkolemm und im Inneren der oxydativen Fasern. Die Resultate für MCT2 waren von geringerer Stärke (Abb. 10B2 & 10B3).

AUSWERTUNG

Es scheint, dass die Funktion von Laktat drei Hauptmerkmale auf der Ganzkörperebene aufweist: Laktat dient als Energiequelle, als glukoneogenetischer Vorläufer und nach den neuesten Befunden auch als Signalmolekül, als „Lactormon“. Mit Hilfe der ersten bei-

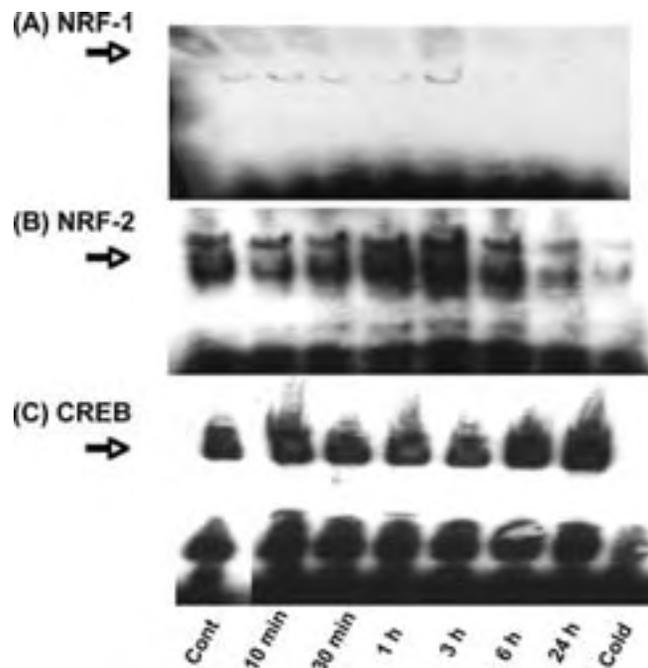


Abbildung 8: DNA-Bindungsaktivitäten in L6-Zellen von (A) NRF-1, (B) NRF-2 und (C) CREB, ermittelt durch EMSA, nach Inkubation in 20 mM Laktat für Zeiträume von 10 min bis 24 h. Die Null-Zeitkontrolle ist in der linken Spur sichtbar. Die Pfeile deuten Bandverlagerungen an. Oligonukleotide und unmarkierte NRF-1, NRF-2 und CREB wurden in der rechten Spur als Cold Controls getestet, die den Band Shift blockierten. Entnommen aus (20). Mit Erlaubnis der amerikanischen Gesellschaften für Experimentelle Biologie.

den Funktionen bewirkt die Produktion und der Abbau von Laktat, dass der Körper sich für eine gewisse Zeit an Belastung anpassen kann. Die dritte Funktion ermöglicht, dass Laktat an langfristigen Prozessen der strukturellen und stoffwechselbezogenen Anpassung an körperliche Belastung beteiligt ist. Zurzeit scheint es, dass MCT1 die wichtigste MCT-Isoform ist, die im Skelettmuskel exprimiert wird. MCT1 ist in den sarkolemmalen, mitochondrialen und peroxisomalen Membranen von gezüchteten Myozyten und erwachsenen Skelettmuskelfasern vorhanden. MCT4 wird stark exprimiert im Sarkolemm von schnellen Muskelfasern, aber wahrscheinlich nicht in den mitochondrialen, peroxisomalen oder anderen intrazellulären Domänen. MCT2 kann in langsamen Muskelfasern nachgewiesen werden, wo es sich wahrscheinlich in sarkolemmalen und mitochondrialen Domänen befindet, aber die Expression von MCT2 ist im Skelettmuskel relativ gering verglichen mit MCT1. Mit der Ausnahme von MCT1 haben wir nur wenig Informationen über die Regulierung von MCT-Proteinexpression, allgemein oder spezifisch als Reaktion auf akute körperliche Belastung oder Training. Ausdauertraining erhöht sarkolemmales und mitochondriales MCT1 im Muskel, allerdings nicht die MCT4-Proteinlevel. MCT1-Proteinexpression scheint, jedenfalls teilweise, während der Transkription reguliert zu werden. Tatsächlich scheint MCT1 Teil eines weitläufigen ROS-sensitiven Signalnetzwerks zu sein, das mitochondriale Biogenese im Muskel sowie andere Adaptionen reguliert, die in Reaktion auf sportliche Belastung erfolgen (20). Die Vorstellung, dass Laktat im Muskel als Reaktion auf O₂-Mangel produziert wird und dass Laktatakkumulation den Muskel ermüdet, geht auf Studien des frühen 20. Jahrhunderts zurück, die mit nicht zirkulierenden und nicht ausreichend mit Sauer-

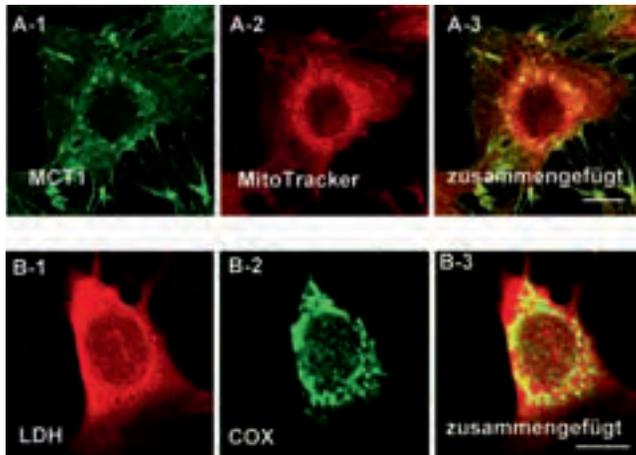


Abbildung 9: Immunhistochemische Bilder demonstrieren einige der Komponenten des Laktatoxidationskomplexes in gezüchteten L6-Muskelzellen. Dieser Komplex schließt den mitochondrialen Bestandteil Cytochrom-Oxidase (COX), das Laktat-Pyruvat-Transportprotein (MCT1), Laktatdehydrogenase und andere mit ein. (A) Kollokalisierung von MCT1 und dem mitochondrialen Retikulum. MCT1 wurde an beiden Domänen festgestellt: den sarkolemmalen und den intrazellulären (A-1). Durch die Benutzung von MitoTracker war das mitochondriale Retikulum sehr verfeinert und wurde in intrazellulären Domänen in L6-Zellen nachgewiesen (A-2). Als die Signale von Proben für die Laktattransporter (MCT1, grün, A-1) und Mitochondrien (rot, A-2) zusammengefügt wurden, zeigte die Superposition der Signale (gelb) Kollokalisierung von MCT1 und Komponenten des mitochondrialen Retikulums, speziell an perinuklearen Domänen (A-3). In Reihe (B) sind Laktatdehydrogenase (LDH) (B-1) und mitochondriale Cytochrom-Oxidase (COX) (B-2) abgebildet. Die Superposition der Signale für LDH (rot, B-1) und COX (grün, B-2) zeigt Kollokalisierung von LDH im mitochondrialen Retikulum (gelb) von gezüchteten L6-Muskelzellen von Ratte (B-3). Tiefenschärfe ~1 mm, Maßstabsbalken=10 mm, Entnommen aus (18). Mit Erlaubnis der American Physiological Society.

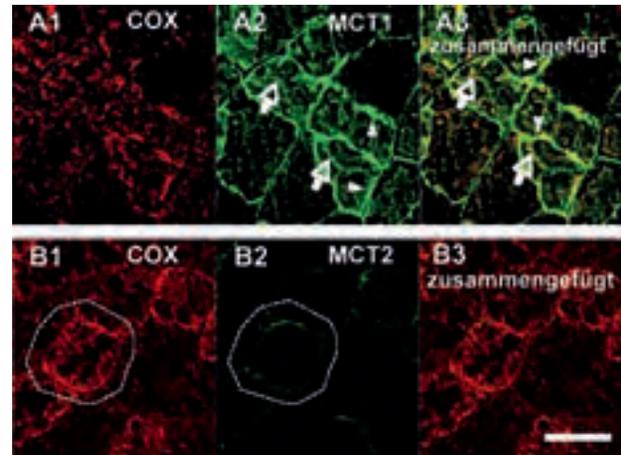


Abbildung 10: Zelluläre Lage von MCT1- und MCT2-Laktattransporter-Isoformen und des mitochondrialen Retikulums (Cytochrom-Oxidase, COX) in ausgewachsenem Plantaris-Muskel von Ratten, dargestellt mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) und fluoreszierender Marker für die jeweiligen Proteine: Vergleiche für MCT1 in der ersten Reihe (Platten A1-A3) und für MCT2 in der zweiten Reihe (Platten B1-B3). Die Lokalisierung von COX wurde im Plantaris-Muskel von Ratte nachgewiesen (Platten A1 und B1). MCT1 wurde in allen Zellen festgestellt, auch subsarkolemmal (Pfeilspitzen) und interfibrillär (Pfeile) (Platte A2). MCT1-Vorkommen war am größten in oxidativen Fasern, wo COX häufig vorkommt und das Signal stark ist. Als diese MCT1 (grün) und COX (rot) zusammengefügt wurden, ergab die Superposition der zwei Marker gelb, mit markanten Funden an interfibrillären (Pfeilen) und sarkolemmalen (Pfeilspitzen) Zelldomänen (Platte A3). Im Gegensatz dazu war das Signal für MCT2 (Platte B2) schwach und relativ besser bemerkbar in den Fasern mit starker Färbung für COX (Platten B1 und B3, die gebrochene Linie, um die oxidativen Fasern soll das schwache Signal für MCT2 verdeutlichen). Die Überlappung von MCT2 und COX ist geringfügig, erkennbar durch die Abwesenheit von Gelb in Platte B3. Maßstabsbalken=50 mm. Die Abschnitte sind vom selben Tier. Entnommen aus (21). Mit Erlaubnis der Physiological Society (London).

stoff versorgten Froschmuskelpräparaten ausgeführt worden sind. Im Vergleich dazu ist es heutzutage weitgehend anerkannt, dass die Laktat-Shuttle-Mechanismen bedeutend sind für die Verteilung eines wichtigen Energiesubstrats und des Hauptvorläufers für die Glukoneogenese. Die vor kurzem gewonnenen Resultate zeigen das Potential, das Laktat als bedeutendes zell-signalisierendes Lactormon hat und können vielleicht die herkömmliche Meinung über Laktat in Zukunft ändern. Laktatproduktion ist mehr als nur eine Reaktion auf Belastungen, vielmehr ist es Teil eines Belastungs-Beanspruchungs-Mechanismus während Muskelkontraktion. Um die ATP-Homöostase zu erhalten, wird die Glykolyse aktiviert und die Produktion und Anhäufung von Laktat angeregt. Im Gegenzug bewirkt die vorübergehende Erhöhung der Laktatkonzentration und der Verbrauch von O₂ in den Mitochondrien die Bildung von ROS, welche wiederum ein transkriptionales Netzwerksignal adaptiver Zellreaktionen aktivieren.

DANKSAGUNG

Gefördert durch NIH Grants R01 AR042906 und R01 AR 050459

Angaben zu finanziellen Interessen und Beziehungen, wie Patente, Honorare oder Unterstützung durch Firmen: keine

LITERATUR

- BERGMAN BC, HORNING MA, CASAZZA GA, WOLFEL EE, BUTTERFIELD GE, BROOKS GA: Endurance training increases gluconeogenesis during rest and exercise in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278 (2000) 244-251.
- BERGMAN BC, WOLFEL EE, BUTTERFIELD GE, LOPASCHUK G, CASAZZA GA, HORNING MA, BROOKS GA: Active muscle and whole body lactate kinetics after endurance training in men. *J Appl Physiol* 87 (1999) 1684-1696.
- BROOKS GA: Lactate shuttles in nature. *Biochem Soc Trans.* 30 (2002) 258-264.
- BROOKS GA, BROWN MA, BUTZ CE, SICURELLO JP, DUBOCHAUD H: Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. *J Appl Physiol* 87 (1999) 1713-1718.
- BROOKS GA, BUTTERFIELD GE, WOLFE RR, GROVES BM, MAZZEO RS, SUTTON JR, WOLFEL EE, REEVES JT: Increased dependence on blood glucose after acclimatization to 4,300m. *J Appl Physiol* 70 (1991) 919-927.
- BROOKS GA, BUTTERFIELD GE, WOLFE RR, GROVES BM, MAZZEO RS, SUTTON JR, WOLFEL EE, REEVES JT: Decreased reliance on lactate during exercise after acclimatization to 4,300m. *J Appl Physiol* 71 (1991) 333-341.
- BROOKS GA, DUBOCHAUD H, BROWN M, SICURELLO JP, BUTZ CE: Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the 'intra-cellular lactate shuttle'. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1129-1134, 1999.
- BROOKS GA UND GLADDEN LB: METABOLIC SYSTEMS: Non-oxidative (Glycolytic and Phosphagen), in: Tipton CM (Hrsg.): EXERCISE PHYSIOLOGY: PEOPLE AND IDEAS. American Physiological Society, 2003, 322-360.

9. **BROOKS GA, WOLFEL EE, BUTTERFIELD GE, CYMERMAN A, ROBERTS AC, MAZZEO RS, REEVES JT:** Poor relationship between arterial [Laktat] and leg net release during steady-rate exercise at 4,300 m altitude. *Am J Physiol* 275 (1998) 1192-1201.
10. **BROOKS GA, HASHIMOTO T:** Investigation of the Laktat shuttle in skeletal muscle mitochondria. *J Physiol* 584 (2007) 705-706.
11. **CHO M, HUNT TK, HUSSAIN MZ:** Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. *Am J Physiol* 280 (2001) 2357-2363.
12. **CONSOLI AN, NURJHAN JJ, REILLY JR, BIER DM, GERICH JE:** Contribution of liver and skeletal muscle to alanine and Laktat metabolism in humans. *Am J Physiol* 259 (1990) 677-684.
13. **DONOVAN CM UND BROOKS GA:** Endurance training affects lactate clearance, not lactate production. *Am J Physiol* 244 (1983) 83-92.
14. **DUBOCHAUD H, BUTTERFIELD GE, WOLFEL EE, BERGMAN BC, BROOKS GA:** Endurance training, expression and physiology of LDH, MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 278 (2000) 571-579.
15. **FRIEDLANDER AL, CASAZZA GA, HORNING MA, HUIE MJ, PIACENTINI MF, TRIMMER JK, BROOKS GA:** Training-induced alterations of carbohydrate metabolism in young women: women respond differently from men. *J Appl Physiol* 85 (1998) 1175-1186.
16. **GARCIA CK, GOLDSTEIN JL, PATHAK RK, ANDERSON RG, BROWN MS:** Molecular characterization of a membrane transporter for Laktat, pyruvate and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 76 (1994) 865-873.
17. **GERTZ EW, WISNESKI JA, STANLEY WC, NEESE RA:** Myocardial substrate utilization during exercise in humans: dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest* 82 (1988) 2017-2025.
18. **HASHIMOTO T, HUSSIEN R, BROOKS GA:** Colocalization of MCT1, CD147 and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 cells: Evidence of a mitochondrial Laktat oxidation complex. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 (2006) 1237-1244.
19. **HASHIMOTO T, HUSSIEN R, CHO HS, KAUFER D, BROOKS GA:** Evidence for a mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: a crucial component for a brain lactate shuttle. *PloS-One* 3 (2008) 2915.
20. **HASHIMOTO T, HUSSIEN R, OOMMEN S, GOHIL K, BROOKS GA:** Lactate sensitive transcription factor network in L6 myocytes: activation of MCT1 expression and mitochondrial biogenesis. *FASEB Journal* 21 (2007) 2602-2612.
21. **HASHIMOTO T, MASUDA S, TAGUCHI S, BROOKS GA:** Immunohistochemical analysis of MCT1, MCT2 and MCT4 expression in rat plantaris muscle. *J Physiol (London)* 567 (2005) 121-129.
22. **MAZZEO RS, BROOKS GA, SCHOELLER DA, BUDINGER TF:** Disposal of [1-13C]-Laktat during rest and exercise. *J Appl Physiol* 60 (1986) 232-241.
23. **MCCLELLAND GB, KHANNA S, GONZÁLEZ GF, BUTZ CE, BROOKS GA:** Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system? *Bioch and Biophys Res Com* 203 (2003) 130-135, 2003.
24. **MILLER BF, FATTOR JA, JACOBS KA, HORNING MA, SUH SH, NAVAZIO F, BROOKS GA:** Metabolic and cardiorespiratory responses to an exogenous Laktat infusion during rest and exercise: "The Lactate Clamp." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283 (2002) 889-898.
25. **PRICE NT, JACKSON VN, HALESTRAP AP:** Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of transporter family with an ancient past. *Biochem J* 329 (1998) 321-328.
26. **RICHARDSON RS, NOYSZEWSKI EA, LEIGH JS, WAGNER PD:** Lactate efflux from exercising human skeletal muscle: role of intracellular PO₂. *J Appl Physiol* 85 (1998) 627-634.
27. **STANLEY WC, GERTZ EW, WISNESKI JA, MORRIS DL, NEESE L, BROOKS GA:** Lactate metabolism in exercising human skeletal muscle: Evidence for Laktat extraction during net Laktat release. *J Appl Physiol* 60 (1986) 1116-1120.
28. **TRIMMER JK, CASAZZA GA, HORNING MA, BROOKS GA:** Autoregulation of glucose production in men with a glycerol load during rest and exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab* 280 (2001) 657-668.
29. **WRIGHT DC, HAN DH, GARCIA-ROVES PM, GEIGER PC, JONES TE, HOLLOSZY JO:** Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* 282 (2007) 194-199.
30. **YU T, ROBOTHAM JL, YOON Y:** Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006) 2653-2658.

Korrespondenzadresse:
Exercise Physiology Laboratory
Department of Integrative Biology
University of California
Berkeley, CA USA 84720-3140
E-Mail: gbrooks@berkeley.edu