

O-TÍPUSÚ FEHÉRJE GLIKOZILÁCIÓ SZEREPE AZ ÉLŐ SEJTEK STRESSZVÁLASZÁBAN

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Kátai Emese

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Témavezető:

Dr. Nagy Tamás, Laboratóriumi Medicina Intézet



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

PÉCS

2018

„Bárki, aki tudományos kutatásba fog, nem kerülheti el azt a meggyőződést, hogy abban, amit mi természettörvénynek nevezünk, valamilyen szellem nyilvánul meg. Mérhetetlenül kiválóbb szellem ez, mint az emberi értelem, s az embernek a maga szerény képességével alázatot kell érezni előtte.”

Albert Einstein

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
ÖSSZEFOGLALÁS	6
I. BEVEZETÉS	7
I.1. A stresszválasz általános jellemzői.....	7
I.1.1. Celluláris stresszválasz.....	7
I.1.2. Prekondicionálás	10
I.2. Poszt-transzlációs módosulások szerepe a celluláris stresszválaszban.....	13
I.3. O-glikoziláció a celluláris stresszválaszban	14
I.3.1. O-típusú fehérje glikoziláció	14
I.3.2. O-glikoziláció és foszforiláció kölcsönhatása	16
I.3.3. O-glikoziláció és prekondicionálás közötti kapcsolat	18
I.4. O-glikoziláció és fizikai aktivitás szerepe az immunrendszer működésében	20
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	23
III. ANYAG ÉS MÓDSZER	24
III.1. Sejtkultúrák.....	24
III.1.1 Hidrogén-peroxidos kezelés.....	24
III.1.2. Intracelluláris reaktív oxigén szabadgyök meghatározás	25
III.1.3. Jurkat sejtek kezelése.....	25
III.2. Kísérleti edzés önkéntesekkel	26
III.2.1. Humán vérminták feldolgozása.....	27
III.3. Western blot.....	27
III.4. Sejtviabilitás.....	29
III.5. Immunfluoreszcencia	29
III.6. Valós idejű polimeráz láncreakció	30
III.7. Áramlási citometria	31

III.8. Statisztikai elemzés	31
IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	32
IV.1. Oxidatív kezelés hatása az O-glikozilációra neuroblasztóma sejtvonalon.....	32
IV.1.1. Eredmények	32
IV.1.2. Megbeszélés	40
IV.2. O-glikoziláció módosulás humán fehérvérsejtekben akut testedzést követően.....	43
IV.2.1. Eredmények	43
IV.2.2. Megbeszélés	50
V. ÚJ EREDMÉNYEK TÉTELES ÖSSZEFOGLALÁSA.....	54
IRODALOMJEGYZÉK	55
PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK.....	69
Disszertáció alapjául szolgáló publikációk	69
Egyéb eredeti közlemények.....	70
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	71
DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LENYOMATA	72

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADP	Adenozin-difoszfát
ATF6	Aktiváló transzkripció faktor 6
ATM	Ataxia teleangiectázia mutált
ATP	Adenozin-trifoszfát
ATR	Ataxia teleangiectázia és Rad-3- fehérje
BSA	Szarvasmarha szérum albumin
cAMP	Ciklikus adenozin monofoszfát
CREB18	cAMP-érzékeny válasz elem-kötő fehérje
EDTA	Etiléndiamin-tetraecetsav
EGTA	Etilénglikol-tetraecetsav
EMEM	Eagle-féle minimális esszenciális médium
ER	Endoplazmatikus retikulum
ETC	Elektrontranszportlánc
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DNS-PK	DNS-függő protein kináz
DDR	DNS károsodási válasz
ER	Endoplazmatikus retikulum
ERK	Extracelluláris szignál által regulált kinázok
FBS	Fötális szarvasmarha szérum
Fruktóz-6-P	Fruktóz-6-foszfát
FSc	Előreirányú fényszórás
GFAT	L-glutamin-D-fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz
GlcNAc	N-acetilglükózamin
Glükóz-6-P	Glükóz-6-foszfát
Glükózamin-6-P	Glükózamin-6-foszfát
GLUT	Glükóz transzporter
HBP	Hexózamin bioszintézis útvonal
HBSS	Hanks pufferelt sóoldat
HSP	Hőszokkfehérje
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IRE1	Inozitol-függő enzim 1
IRS-1	Inzulin receptor szubsztrát 1
JNK	c-Jun N-terminális kináz
K-EDTA	Kálium- etiléndiamin-tetraecetsav
LDH	Laktát-dehidrogenáz
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz

MHC	Fő hisztokompatibilitási komplex
mRNS	Hírvivő ribonukleinsav
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált forma
NaF	Nátrium-fluorid
NEAA	Nem esszenciális aminosav
NFAT	Aktivált T-sejt nukleáris faktor
NF- κ B	Nukleáris faktor- kappa B
OGA	O- β -N-acetilglükózaminidáz
O-GlcNAc	O- β -N-acetilglükózamin
OGT	O- β -N-acetilglükózamin transzferáz
PAGE	Poliakrilamid-gélelektroforézis
PBGD	Porfobilinogén deamináz
PBS	Foszfát pufferes sóoldat
PERK	Protein kináz RNS endoplazmatikus retikulum kináz
PI3K	Foszfatidil-inozitol-3 kinázok
PP2A	Protein-foszfataz 2
PKR	Protein kináz R
PUGNAc	O-(2-Acetamido-2-deoxi-D-glükopiranozilidenamino) N-
PVDF	Polivinil-difluorid
RIPA	Radioimmunprecipitációs esszé puffer
ROS	Reaktív oxigén származékok
RNS	Reaktív nitrogén származékok
rpm	Percenkénti fordulatszám
RT-PCR	Valós idejű polimeráz láncreakció
SD	Standard deviáció
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
S.E.M.	Standard hiba
Ser	Szerin
SLC	Szolubilis hordozó transzporter
SSc	Oldalirányú fényezés
synGAP19	Szinaptikus guanozin-trifoszfataz aktiváló fehérje
TNF- α	Tumor nekrozis faktor alfa
Thr	Treonin
UDP-GlcNAc	Uridin-difoszfát-N-acetilglükózamin
UDP	Uridin-difoszfát
UPR	Sérült fehérjeválasz

ÖSSZEFOGLALÁS

Az O-glikoziláció egy dinamikus, reverzibilis, a sejtek metabolikus állapotát közvetítő fehérje poszt-transzlációs módosulás. Szabályozó szerepe ismert az acetilációval, metilációval, ubikvitinációval, nitrozilációval kapcsolatban, de legrészletesebben vizsgált a foszforilációval való kompetíció. Az utóbbi időkben felmerült az O-glikoziláció stressz adaptációban illetve prekondicionálásban betöltött jelátvivő szerepe is.

Dolgozatom alapját képező munka első felében az O-glikoziláció dinamikáját, tau foszforilációval való kapcsolatát vizsgáltuk akut oxidatív stressz hatására különböző regenerációs időpontokban humán neuroblasztóma sejtvonalon (SH-SY5Y). Western blot módszerrel kimutattuk, hogy rövid ideig oxidatív stressznek kitett sejtek szintjén az intracelluláris fehérjék O-glikozilációjának mértéke hirtelen emelkedett, majd közel a kiindulási szintre tért vissza a regenerációs periódus végére. Az O-glikoziláció szabályozásában résztvevő főbb enzimek expressziós szintjénél is hasonló kinetikát tapasztaltunk. A tau foszforiláció esetében az O-glikozilációval ellentétes változásokat észleltünk. Eredményeink azt mutatják, hogy az O-glikoziláció fontos szerepet játszik a stressz adaptációban, valamint a tau foszforilációval való kapcsolatának ismerete hozzájárulhat az Alzheimer kór patofiziológiájának pontosabb megértéséhez.

A munka második felében az O-glikoziláció változását vizsgáltuk egyszeri fizikai aktivitáson részt vett önkéntesek vérmintáiból izolált fehérvérsejteken. Kísérleteink során nem csak az összfehérvérsejtek, hanem az azt alkotó alpopulációk O-glikoziláltsági állapotára is kíváncsiak voltunk, amelyeket áramlási citometria segítségével vizsgáltunk meg. Eredményeink azt mutatták, hogy fizikai aktivitás hatására az összfehérvérsejtekben szignifikáns O-glikozilációs változás figyelhető meg a nyugalmi periódusban gyűjtött mintákhoz képest. Fehérvérsejt alpopulációk szintjén főként a limfociták és monociták csoportjában volt kifejezett az O-glikozilációs változás. Bár ennek a komplex funkciónak a megértése további vizsgálatokat igényel, a mechanizmus ismeretétől függetlenül az O-glikoziláció mérése humán mintákban hasznos kiegészítője lehet a laboratóriumi diagnosztikának; például alkalmas lehet sportolók fizikai állapotfelmérésére, metabolikus szindrómás betegek szűrésére.

I. BEVEZETÉS

I.1. A STRESSZVÁLASZ ÁLTALÁNOS JELLEMZŐI

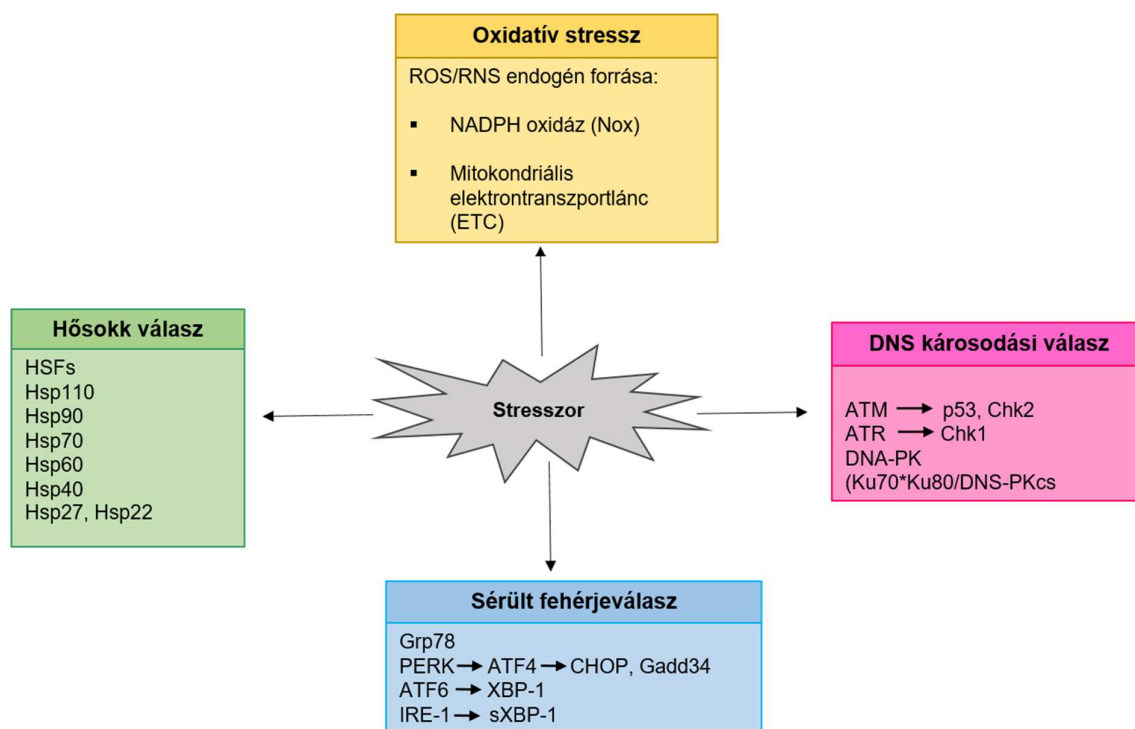
A stressz fogalmának bevezetése Selye János nevéhez fűződik. Értelmezésében a stressz az a nem specifikus válasz, mely a szervezet egészét érintő alkalmazkodási folyamatot képes elindítani, ezáltal ösztönözve, hogy a kihívásokra, ingerekre reagáljon [1]. A stresszorok hatására bekövetkező testi reakciókat általános adaptációs szindrómának nevezte el, és három fő szakaszra különítette. A *vészreakció*ban a szervezet felkészül a fokozott alkalmazkodásra, ez az úgynevezett „harc vagy menekülés” ideje. Az *aktív ellenállás* vagy *adaptáció fázis*ában a szervezet további energiatartalékokat mozgósít, mely hosszabb-rövidebb ideig a szervezet igényeit a stresszonnal szemben még képes kielégíteni. A stresszor tartós fennállása esetén következik a *kimerülési fázis*, amikor a tartalékok kimerülnek, a szervezet ellenálló képessége lecsökken, rohamos hanyatlás áll be [2].

I.1.1. Celluláris stresszválasz

A stressz fogalma a sejtek szintjén is értelmezhető. A sejtek az őket ért változások hatására megpróbálják belső környezetüket egy szűk tartományon belül tartani. Ezt a dinamikus egyensúlyt nevezzük intracelluláris homeosztázisnak, amely válaszként stabilizálja a sejtek belső környezetét a megváltozott külső környezettel szemben [3]. Ez a fiziológiai homeosztázis könnyen veszélybe kerülhet, ha a sejtet olyan stresszhatások érik, mint például UV sugárzás, hősokk, oxidatív stressz, mérgező anyagok, ozmotikus sokk, extracelluláris ligandok [3,4]. A különböző mikrokörnyezeti stresszorokra adott védekező mechanizmus a celluláris stresszválasz, ami képes a sejtek aktuális tolerancia szintjét emelni. A sejtípustól, a stressz időtartamától, illetve annak súlyosságától függően a celluláris válasz sokrétű lehet. Ha a küszöbértéket a stressz-inger nem haladja meg, a sejt képes a megbomlott egyensúlyi állapotának helyreállítására. Amennyiben a károsodás egy bizonyos küszöbértéket meghalad, elégtelen adaptáció eredményeként sejt hipertrófia, hiperplázia, atrófia és metaplázia alakul ki, illetve különböző sejtpusztulási útvonalak aktiválódnak: apoptózis, nekrozis és autofágia [3,5]. Az elégtelen adaptáció esetében illetve a sejtpusztulás előidézésében mitogén-aktivált protein

kináz (MAPK) kaszkádok: a *JNK* (c-Jun N-terminális kináz) és a *p38-út* játszanak szerepet [6,7], amelyek ugyanakkor nagy jelentőséggel bírnak számos betegség kialakulásában is, mint az iszkémia, atheroszklerózis, neurodegeneratív elváltozások és tumorok.

A különböző stressz-ingerek (vírusok, baktériumok, sugárzás, környezeti toxinok) különböző sejt-védő mechanizmusokat indukálhatnak, amelyek képesek a sejtek homeosztázisának visszaállítására. Ezek a celluláris stresszválaszok lehetnek: oxidatív stresszválasz, hő sokkválasz, sérült fehérjeválasz (unfolded protein response, UPR) és DNS károsodási válasz (1.ábra) [5].



1. ábra. Celluláris stresszválaszok és főbb stresszfehérjéi. (Módosított ábra)
 (Kép forrása: Muralidharan S, Mandrekar P (2013) *J Leukoc Biol.* 94(6): 1167-1184)

A megbomlott egyensúly, mely a reaktív oxigén/nitrogén származékok (ROS/RNS) túlzott emelkedésének és az antioxidánsok csökkenésének eredménye, oxidatív stresszt eredményez. Az endogén oxidálószerkező különböző anyagcseretermékek metabolitjai vagy melléktermékei, melyek a mitokondriumokban zajló aerob anyagcseréből vagy a ciklooxigenáz, a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) és xantin-oxidáz által közvetített reakciókból képződnek. Az endogén ROS képződése főként két sejtorganelumban történik: az endoplazmatikus retikulumban (ER) és a mitokondriumban. Az ER-ben a diszulfid kötések oxidatív átalakulása a fehérje összehajtogatás (folding) során ROS felhalmozódáshoz vezethet. A legfontosabb

endogén ROS forrás azonban a mitokondrium, ahol intenzív aerob metabolizmus zajlik, ugyanakkor itt redukálódik az elektrontranszportlánc végén lévő molekuláris oxigén is szuperoxidionná [5,8]. Exogén tényezők is képesek ROS-t előidézni; kémiai ágensek közül főként a hidrogén-peroxid, fizikai faktorok esetében az UV sugárzás rendelkezik ilyen hatással. A felhalmozódott oxidálószerekkel szemben a sejtek az oxidatív stressz kivédésére antioxidáns fehérjék fokozottabb termelésével válaszolnak [9], azonban javíthatatlan károsodás esetén kaspázok által közvetített apoptózist indukálhatnak.

Az oxidatív stressz, a nehézfém mérgezés, hőhatás, fertőzések hősokkfehérjéket (HSP) aktiválva hősokkválaszt eredményeznek. Ezeknek a stressz-ingereknek egyik fő celluláris következménye a fehérje károsodás, mely a denaturálódott fehérjék aggregálódásához vezet. A hősokkfehérjék az eukarióta sejtek citoplazmájában, nukleoluszában, ER-ben és mitokondriumaiban expresszálódnak. Olyan ATP-függő molekuláris chaperone fehérjék, amelyek képesek a fehérje denaturálódást megakadályozni és ezáltal csökkentik a fehérje aggregáció mértékét [10].

Az ER a stresszválasz kialakulása szempontjából egy fontos sejt kompartmentum, ahol a szekretált, membránhoz kötött, sejtorganellum-specifikus fehérjék transzlációs módosulása, foldingja történik. Stressz-ingerek, mint a tápanyaghiány, hipoxia, vagy vírusfertőzés, megzavarhatják a folding folyamatot, ami hiányos vagy sérült fehérjék keletkezéséhez vezethet, ezáltal UPR-t eredményezve [11,12]. Emlőssejtekben az UPR-t három stresszérzékelő, az inozitol-függő enzim 1 (IRE1), az aktiváló transzkripciós faktor 6 (ATF6) és a protein kináz R (PKR)-szerű ER kináz (PERK) közvetíti, amelyek érzékelik a fehérje folding körülményeit és a megfelelő jeleket az UPR célgének felé továbbítják. Amennyiben az ER stressz krónikus és/vagy igen kiterjedt mértékű, úgy az UPR programozott sejthalált is indukálhat [12].

A DNS károsodási választ (DNA Damage Response, DDR), ami egy szintén stressz által közvetített út, a környezeti genotoxikus és kémiai anyagok okozta DNS léziók aktiválják. A DDR fő szabályozói a primér transzdukciós fehérjék, mint az ataxia teleangiectázia mutált fehérje (ATM), az ATM fehérjével rokon (ATR, ataxia teleangiectázia és Rad-3- fehérje) fehérje komplexum és a DNS-függő protein kináz (DNS-PK), amelyek a foszfatidil-inozitol-3 kinázok (PI3K) családjába tartoznak [12]. Mindegyik fehérje különböző DNS-károsodás miatt aktiválódik, és specifikus jelátviteli utakat stimulál [13].

Ezek az intracelluláris adaptációs mechanizmusok, a receptor kötődésen át a jelátviteli és gén transzkripciós folyamatokon keresztül egészen a fehérjeszintézisig, [4] hozzájárulnak a sejtek túlélőképességéhez a sejtciklus szabályozásával, funkcionális fehérjék javításával és/vagy

stabilizálásával, sérült molekulák eltávolításával, a tárolt energiatartalékok mozgósításával, valamint a metabolikus útvonalak módosításával [5,14,15]. Ezekben a mechanizmusokban a celluláris fehérjék szabályozása több szinten is végbemegy, megváltoztatva így a fehérje-degradációt (kaspázok aktiválása) és szintézist (transzkripció változás, UPR) illetve a fehérjefunkciót [11,16,17].

I.1.2. Prekondicionálás

A sejtek túlélőképessége a tolerancia fokozásával növelhető, ezt a fiziológiai folyamatot prekondicionálásnak is nevezzük. A prekondicionálás egyfajta *stressz-edzésnek* is megfeleltethető, amikor alacsonyabb dózisban, ugyanazzal a stresszorzattal szemben alakul ki a tolerancia, illetve *kereszttoleranciának*, ha egy adott stresszrel szembeni előkondicionálás eredményeként más stressz-ingerrel szemben is ellenállóbbá válik a sejt. Ennek a folyamatnak az alapja a stresszválasz nem specifikus tulajdonsága, ugyanis a különböző stresszhatások stresszfehérjéket indukálhatnak/aktiválhatnak. Ezek a stresszfehérjék képesek a különböző eukarióta sejteket a hőmérsékleti és pH változásokkal, ionizáló sugárzással valamint kémiai behatásokkal szemben prekondicionálni. Így a stresszfehérjék általános sejtvédő tulajdonságuknak (fehérje-, DNS védelem, szabadgyök fogás) köszönhetően ellenállóbbá teszik a sejteket a stresszorokkal szemben [3].

Az egyik legtöbbet tanulmányozott prekondicionálási mechanizmus az iszkémás prekondicionálás, ami egy veszélytelen, rövid ideig tartó, az egyes szervek vagy szövetek vérellátásának felfüggesztésével járó folyamat, amelyet egy szintén rövid ideig tartó reperfúziós időszak követ megelőzve az iszkémiás reperfúziós károsodás előidézését [18]. A iszkémiás prekondicionálásnak főként a miokardiális, agyi és renális iszkémiás sérülés elleni védekezésben van jelentős szerepe [19–21]. Két formája ismert: a *lokális*- illetve *távoli* iszkémiás prekondicionálás. Mindkét esetben számos endogén molekula játszik közre a jelátviteli folyamatokban, melyek közül legtöbbször sejtvédő hatása van. A távoli iszkémiás prekondicionálás alapjául három fő útvonal szolgál: *i.) humorális* (adenozin [22], bradikinin [23], opioid [24], endokannabinoid [25]), *ii.) neurogén* (adenozin [26], bradikinin [27] és kalcitonin génnel rokon peptid [28]) valamint *iii.) szisztémás útvonal* (gyulladás/apoptózis [29,30]) [20]. Mind a humorális, mind a neurogén útvonal képes különböző kináz-kaskádokat indukálni, amelyek gátolva a mitokondriális permeabilitást, megakadályozzák a sejtek halálát.

Szisztémás útvonalon keresztül a távoli iszkémiás prekondicionálás képes modulálni az immunsejtek gén- és receptor expresszióját, így a gyulladással szemben képes csökkenteni a károsodás mértékét [31]. Peralta és mtsai (2001) kimutatták, hogy az iszkémiás prekondicionálás révén a máj is ellenállóbbá válik az iszkémiás-reperfúziós károsodással szemben. Munkájukban a máj prekondicionálásnak hatását távoli szervekben is vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a májból történő szisztémás TNF- α felszabadulás csökkentésével távoli szervekben is megakadályozható a gyulladással szembeni károsodás [30]. Ez a sejtvédő hatás közvetlenül az inger alkalmazása után (korai védelmi ablak) valamint az azt követő napokban vagy hetekben (második védelmi ablak) is észlelhető volt [31]. Klinikai gyakorlatban az iszkémiás prekondicionálást ötperces periódusokra ütemezik, amelyet ötperces reperfúzió választ el, közvetlenül a célszerv iszkémia-reperfúziós sérülése előtt. Az iszkémiás prekondicionálás hatékonysága nagyban függ az előkezelt szövetek térfogatától, prekondicionálás időtartamától, a reperfúziótól és az iszkémiás prekondicionálás és az iszkémiás reperfúzió károsodás közötti eltelt időtől [20].

A másik fő prekondicionálási folyamat a fizikai aktivitás általi prekondicionálás. A kifejezést elsőként a szakirodalomban Radák és mtsai vezették be, utalva a fizikai edzés hatására a szívizomban az oxidatív stresszel szemben kialakult ellenálló képességre [32]. Mint ismert, a fizikai aktivitás nem csak a szív- és érrendszert befolyásolja jótékonyan, hanem pozitív hatással van a mozgásszervi, légúti, endokrin, idegi, humorális és celluláris immunrendszerre is. A fizikai aktivitás általi prekondicionálás kritikus fontosságú az iszkémiás-reperfúzió következtében fellépő oxidatív stressz és károsodás enyhítésében, a glükóz intolerancia és az inzulinrezisztencia csökkentésében, ízületi atrófia megelőzésében és az öregedési folyamatokban is [32–35]. Már korai tanulmányok is leírták a mérsékelt fizikai aktivitásnak az immunrendszer működésére kifejtett pozitív hatását [36]. Graham és kutatócsoportja fizikai prekondicionálás során, interleukin-6 (IL-6) és iszkémiás reperfúzió kapcsolatát vizsgálva egerekben bebizonyította, hogy a testmozgás IL-6-on keresztül kardioprotekciót eredményez [37]. A megváltozott immun-mediált válaszok révén, a fizikai edzés egyfajta kiegészítő terápia is lehet olyan betegségekben, mint a depresszió, szorongás, szív-, érrendszeri, anyagcsere és daganatos betegségekben illetve autoimmun kórfolyamatokban [38]. A mechanizmus, amellyel a fizikai edzés a veleszületett és szerzett immunitást befolyásolja még nem tisztázott, de nagymértékben függ a fizikai gyakorlat típusától, intenzitásától valamint az időtartamától.

A fizikai aktivitás általi prekondicionálást nem csak az immunrendszer esetében, hanem az agyi infarktus kockázatának csökkenésénél valamint a transzplantált csontvelői sejtek túlélésével

kapcsolatban [39] is vizsgálták. Ding és mtsai (2004) azt találták, hogy a csökkent agyi károsodás a fizikai edzés hatására fokozottan expresszáldó neurotrofinnak és angiogenezisnek tulajdonítható [40]. A fizikai edzés jótékony hatása a csontvelői sejtekre és mikrokoznyezetükre régóta ismert. Bizonyított, hogy a fizikai aktivitás képes a hemopoetikus sejteket a sugárzástól megvédeni illetve növelni a hemopoetikus progenitor sejtek számát. Ezek az adaptációs folyamatok a mezenchimális őssejtek differenciálódásának módosulásai révén valósulnak meg [41].

Összegezve a prekondicionálás is egyfajta stressz, melyre a sejteknek különböző védő mechanizmusokkal reagálniuk kell. A stresszvázasz mögött olyan molekuláris folyamatok zajlanak, mint a mitokondriális és szabadgyökfogó rendszer elemeinek aktiválása, hősokk fehérjék fokozott expressziója [42–44]. Bár ez egy elég intenzíven tanulmányozott terület, a folyamatok aktiválásának megértése még mindig nem teljesen tisztázott.

I.2. POSZT-TRANZLÁCIÓS MÓDOSULÁSOK SZEREPE A CELLULÁRIS STRESSZVÁLASZBAN

A stresszválasz útvonalakat, ideértve a kanonikus útvonalakat, mint az oxidatív stressz, hiperozmotikus stressz, DNS károsodás, hősokk, hipoxia, ER stressz és gyulladások, közös szerkezeti felépítés jellemzi, aminek alkotói a szenzorok, transzkripciós faktorok valamint kináz/foszfataz transzformátorok [45,46]. Ennek a struktúrának köszönhetően a sejtes stresszválaszokat különböző genomikai, transzkripciós, translációs és poszt-transzlációs folyamatok aktiválják és szabályozzák.

Ezek közül a legjobban tanulmányozható a transzkripció által közvetített folyamat, mely során a transzkripciós faktor indukálta stresszgének segítik a sejtek homeosztázisának visszaállítását, valamint a sejttanyagcserét, a proliferációt és az apoptózist is szabályozzák. A transzkripciós gén-indukció a sejt stressz-tűrőképességét meghaladó nagyfokú stresszszorongással szemben fellépő egyfajta válaszreakció, ugyanakkor önmagában ez a folyamat egy hirtelen bekövetkező, erőteljes adaptációhoz nem elegendő, mivel a transzkripció aktiválásától az új gének szintéziséig illetve megfelelő fehérje mennyiség eléréséig több óra, akár nap is eltelhet [46].

Ezzel szemben a poszt-transzlációs módosulás egy olyan általános adaptatív mechanizmus, mely transzkripciós aktivitást nem igényelve számos stressz útvonalon működik. Akut vagy krónikus, bizonyos küszöbértéket nem meghaladó stresszre adott gyors válasz, mely képes akár már a korábban transzkripció során keletkezett stresszfehérjéken keresztül is hatni [46]. Ezek a poszt-transzlációs módosulások különfélék lehetnek, beleértve a reverzibilis kovalens módosításokat (például foszforiláció, metiláció, acetiláció, O-glikoziláció, ubikvitináció és sumoiláció), alloszterikus vagy nem alloszterikus szabályozást (enzim gátlása végtermék által) vagy fizikailag indukált fehérje szerkezeti változásokat (például magas hőmérséklet, mechanikai erők) [47–49].

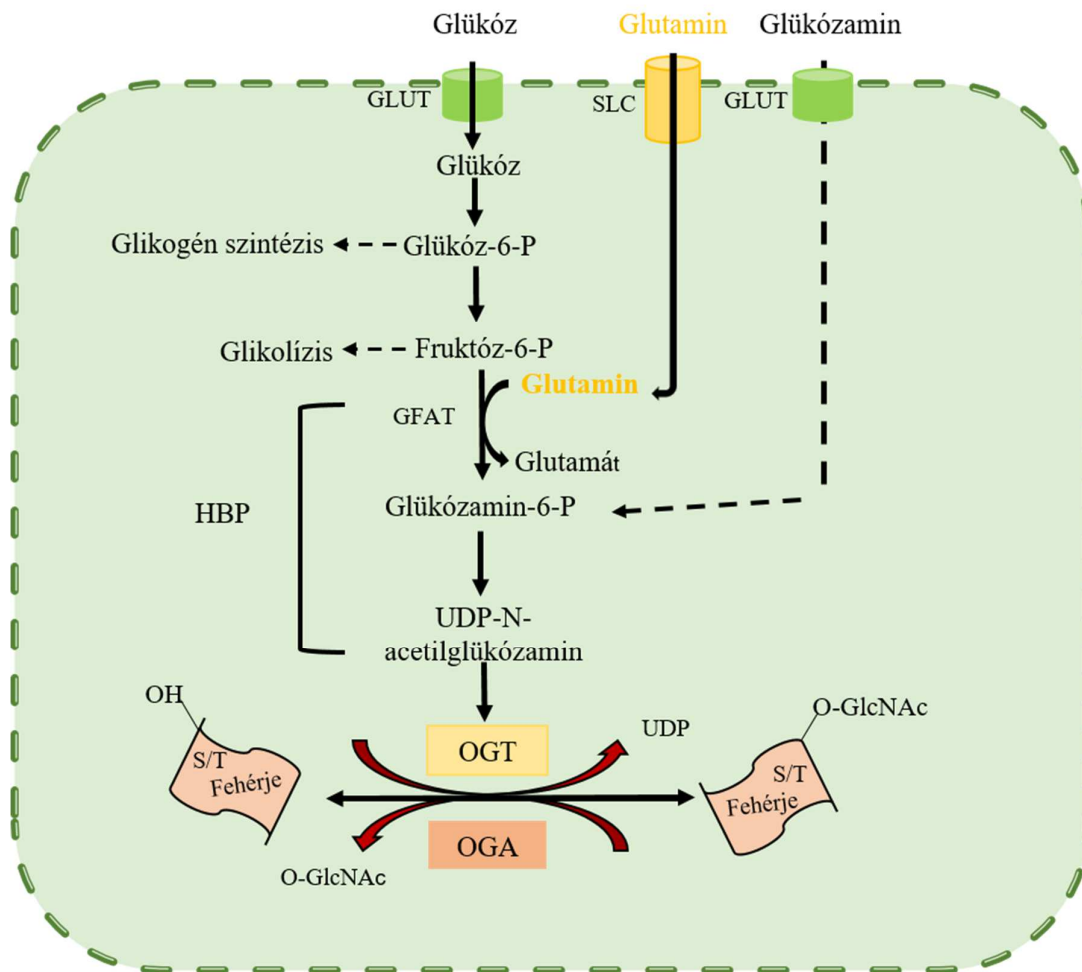
Összességében a poszt-transzlációs módosulások reverzibilis vagy irreverzibilis fehérje szerkezeti, stabilitási és funkcióváltozásokat képesek előidézni a sejt integritásának megőrzése céljából.

I.3. O-GLIKOZILÁCIÓ A CELLULÁRIS STRESSZVÁLASZBAN

I.3.1. O-típusú fehérje glikoziláció

Az O-típusú fehérje glikoziláció egy poszt-transzlációs módosulás, mely eukarióta sejtek, baktériumok Golgi apparátusaiban megy végbe. A folyamat során 1-3 cukoregység kapcsolódik a fehérjék szerin (Ser), treonin (Thr), hidroxilizin vagy hidroxiprolin aminosavainak hidroxilcsoportjához. A kapcsolódó szénhidrátreszekre nem jellemző a közös szerkezet, így lehetnek N-acetil-galaktózamin, N-acetil-glükózamin, fukóz, glükóz, galaktóz, mannóz, növényekben arabinóz cukoregységek, melyek a polipeptidláncon szintetizálódnak, specifikus glikoziltranszferázok által katalizált hozzáadással. A glikoproteineknek fontos szerepük van fiziológiás (sejt-sejt, sejt-mátrix kapcsolatok, immunválasz) és kóros folyamatokban (vírus-fertőzés, daganatképződés) egyaránt.

Dolgozatom további részében az O-glikoziláció alatt azt a dinamikus és *reverzibilis* poszt-transzlációs módosulást értem, amely során a *sejtmagban* és *citoszolban* található fehérjék Ser és Thr aminosavainak hidroxilcsoportjára *egyetlen* cukormolekula, az O- β -N-acetilglükózamin kapcsolódik. Napjainkban az egyre javuló technikai feltételeknek köszönhetően (pl. tömegspektrometria) több, mint 3000 nukleáris, citoplazmatikus valamint mitokondriális fehérjéről derült ki, hogy O-glikozilált [50]. Ennek az egyszerű poszt-transzlációs módosulásnak azonban jelentős szerepe van fiziológiás és patofiziológiás folyamatokban. A megváltozott O-glikozilációs módosulás olyan különböző humán kórképek kialakulásához is köthető, mint a kardiovaszkuláris betegségek [51], neurodegeneratív rendellenességek [52,53], cukorbetegség [54–56] és malignus daganatos megbetegedések [57]. A reakciót két enzim katalizálja: egyik az O- β -N-acetilglükózamin-transzferáz (OGT), mely a cukorcsoport addíciójáért felelős, míg az O- β -N-acetilglükózaminidáz (OGA) annak eliminációját végzi. Mindkét enzim nukleáris és citoszolikus elhelyezkedése ismert, azonban az OGT főként nukleárisan, míg az OGA dominánsan a citoplazmában található. A folyamat szubsztrátja, az uridin-difoszfát-N-acetilglükózamin (UDP-GlcNAc), mely a hexózamin bioszintézis útvonal (HBP) végterméke (**2. ábra**). Ebbe az útvonalba sejtípustól függően a szervezetbe jutó glükóz csupán 2-5% -a lép be [58].



2. ábra. Hexózamin bioszintézis útvonala (HBP) és az O-glikoziláció folyamata.
(Saját ábra)

Az O-glikoziláció számos olyan fehérjefunkción hatva fejti ki hatását, amelynek következtében megváltozik a DNS kötés és transzaktiváció [59,60], fehérjék közötti kölcsönhatás és intracelluláris lokalizáció [61], valamint a fehérje lebontás [62]. Korábbi tanulmányokból jól ismert számos transzkripciós faktor O-glikozilációja, mint például a p53, c-myc, nukleáris faktor kappa B (NF- κ B), aktivált T-sejt nukleáris faktor (NFAT), OGT, inzulin receptor szubsztrát 1 (IRS-1) [63,64]. Becslések alapján az O-glikoziláció által módosított fehérjék több mint 25%-a vesz részt a transzkripció szabályozásában [60], így nem meglepő az O-glikoziláció sokoldalú szerepe, melyet jelátviteli folyamatokban, sejtciklus szabályozásban, génexpresszióban, glükóz metabolizmusban valamint a celluláris stresszválaszokban tölt be [54,65].

Az utóbbi évek kutatási eredményei arra utalnak, hogy az O-glikoziláció a celluláris stresszválasz egyik jelentős komponense, ugyanis O-glikoziláció emelkedést figyeltek meg számos szöveti károsodásban illetve olyan celluláris stresszválaszban, amit hőstressz [66,67], oxidatív stressz [68], DNS károsodási stressz (doxorubicin, UV sugárzás) [69–71], hipoxia [72,73], ER stressz (tunikamicin) [74], iszkémia/reperfúzió sérülés [75,76] vagy traumás vérzés [77] okoz. Bizonyított ugyanakkor, hogy az O-glikoziláció felfüggesztése a sejtek pusztulásához vezet [65].

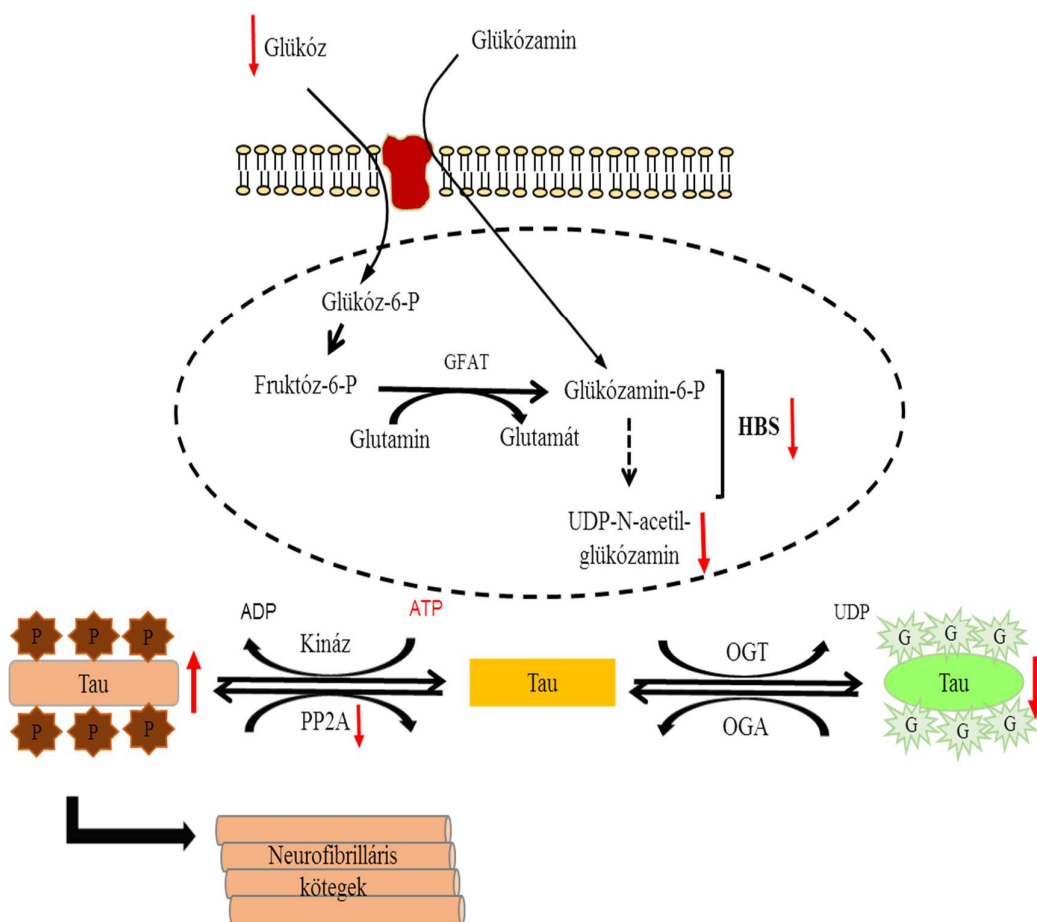
Az O-glikoziláció képes a fehérjék szabályozásában oly módon is részt venni, hogy közvetlen illetve közvetett módon befolyásol más poszt-transzlációs módosulásokat, amelyek szintén kulcsfontosságú szerepet töltenek be a fehérjék funkcióiban illetve jelátviteli folyamataikban. Ennek fényében az O-glikoziláció kölcsönhatását vizsgálták már acetilációval, metilációval, ubikvitinációval, nitrozilációval kapcsolatban is, bár ezek az interakciók még nem teljesen tisztázottak [64,78,79].

I.3.2. O-glikoziláció és foszforiláció kölcsönhatása

Az O-glikoziláció leggyakrabban és legrészletesebben vizsgált kapcsolata a foszforilációval való versengés. Létrejöhet kompetíció azonos Ser és Thr helyekért, ilyenkor az OGT és foszfatázok együttesen, egy stabil úgynevezett *“yin-yang”* komplexet alkotnak [80], de egymáshoz közeli módosítási helyeket is befolyásolhatnak (*“proximal site effect”*) [81]. Ez a fajta kölcsönhatás az O-glikoziláció és foszforiláció között számos fehérje funkció szabályozás terén megfigyelhető (például ismert proto-onkogének, neurofilamentumok, citoskeletális fehérjék esetén) [81,82], ugyanakkor fontos szerepet játszik a krónikus betegségek, mint a cukorbetegség, neurodegeneratív betegségek és a tumor képződés etiológiájában is [83].

A közelmúlt eredményei arra utalnak, hogy a neuronális szövetekben is jelentős mértékű O-glikozilációs módosulás van jelen [84]. Az agyban lévő számos olyan fehérje érintett, amely részt vesz a transzkripcióban, neuronális jelátvitelben és szinaptikus plaszticitásban, ilyenek például a CREB18 (ciklikus adenosin monofoszfát (cAMP)-érzékeny válasz elem-kötő fehérje) [85], synGap19 (szinaptikus guanozin-trifoszfát aktiváló fehérje) [86], β -amiloid prekursor fehérje és tau fehérje [87]. Ezek közül néhány fehérjének kritikus szerepe van a neurodegeneratív betegségek kialakulásában. A tau fehérje egy mikrotubulusokhoz kapcsolt, neuronokban található citoskeletális fehérje, mely foszforilált formában stabilizálja a

mikrotubulusokat. Ismert, hogy a tau fehérje foszforilációja és O-glikozilációja közötti megbomlott egyensúlyi állapot következtében hiperfoszforilált tau fehérjék keletkeznek, melyek aggregálódva az Alzheimer-kór patofiziológiájának fő elemeit, a neurofibrilláris kötegeket képezik [88–90] (3. ábra).



3. ábra. O-glikoziláció és foszforiláció közötti kölcsönhatás. (Módosított ábra)

(Kép forrása: Liu F et al (2009) Brain 132: 1820-1832)

Ennek eredményeként számos kutatócsoport vizsgálta az O-glikoziláció és tau foszforiláció közötti kapcsolatot. Liu és mtsai bizonyították, hogy az agyi glükóz-metabolizmus károsodása is hozzájárulhat az Alzheimer-kór kialakulásához, mivel a csökkent HBP-fluxus a tau fehérjék csökkent O-glikozilációjához vezet, ami a tau fehérjék hiperfoszforilációját eredményezi [90]. Taupátiás egér modellekben kimutatták továbbá hogy akut OGA gátlás révén fokozott O-

glikozilációs módosulás következik be a tau fehérjéken, megakadályozva ezáltal a tau fehérjék hiperfoszforilációját [91,92]. Graham és mtsai OGA hosszú távú gátlásának eredményeként erőteljes tau O-glikozilációs emelkedést, disztrófiás neuronok számának csökkenését észlelték illetve egyfajta védelmet is megfigyeltek a patológiás tau fajták foszforilációjának kialakulásával szemben, anélkül hogy a nem patogén tau foszforilációja változna [91]. Liu és mtsai *in vivo* és *in vitro* körülmények között vizsgálták az O-glikoziláció szerepét a tau foszforilációban. Munkájukban megállapították, hogy az O-glikoziláció helyspecifikus módon szabályozza a tau foszforilációt [93].

Bár ismert, hogy az O-glikozilációt dinamikus és stimuláló idegi ingerek indukálhatják [84], az O-glikoziláció szabályozása akut stressz során neuronális sejtekben még vitatott.

I.3.3. O-glikoziláció és prekondicionálás kapcsolata

Egyre több irodalmi adat igazolja azt a feltételezést, hogy az O-glikozilációnak jelentős szerepe van a celluláris stresszválaszban. Azon jelátviteli mechanizmusok, amelyek O-glikoziláció emelkedést eredményeznek, növelik a stresszel szembeni toleranciát és ezáltal javítják a sejtek túlélését. Főként *in vitro* patkány szívizomsejteken végzett kísérleti eredmények arra engednek következtetni, hogy az O-glikoziláció egyfajta közvetítő is a prekondicionálási folyamatokban kardioprotektív hatása révén. Újszülött patkány szívizomsejtekben mutatták ki, hogy az oxidatív stressz és a hipoxia-reoxigenizáció átmeneti O-glikoziláció emelkedést okoz, növelve a sejtek életképességét és csökkentve a nekrozist és az apoptózist [73,94]. Ugyancsak izolált perfundált patkány szívben glutamin vagy glükózamin adásával előidézett fokozott HBP átáramlás az iszkémia kezdete előtt szignifikánsan növelte az O-glikozilációt, javította a szívizom kontraktilitását és csökkentette a reperfüziót követő szöveti károsodást [95,96]. Steven P. Jones és mtsai kimutatták, hogy O-(2-Acetamido-2-deoxi-D-glükopiranozilidenamino) N-fenilkarbamát (PUGNAc) *in vivo* adása, mely az OGA inhibitora, csökkenti az iszkémia-reperfüzió hatására kialakuló infarktus mértékét egér szívben [68]. A pontos mechanizmus, mely magyarázná az iszkémiás prekondicionálás és emelkedett O-glikoziláció közötti kapcsolatot, még vitatott. Összefüggéseket találtak emelkedett O-glikoziláció és fokozott HSP-40 és HSP-70 transzkripció között, melyek közül az utóbbi fehérje maga is célpontja az O-glikozilációs módosulásnak [97]. Ugyanakkor bizonyított, hogy az O-glikoziláció képes csökkenteni a mitokondriális permeabilitást a Ca^{2+} túltelítődés és a ROS képződés csökkentése révén [73].

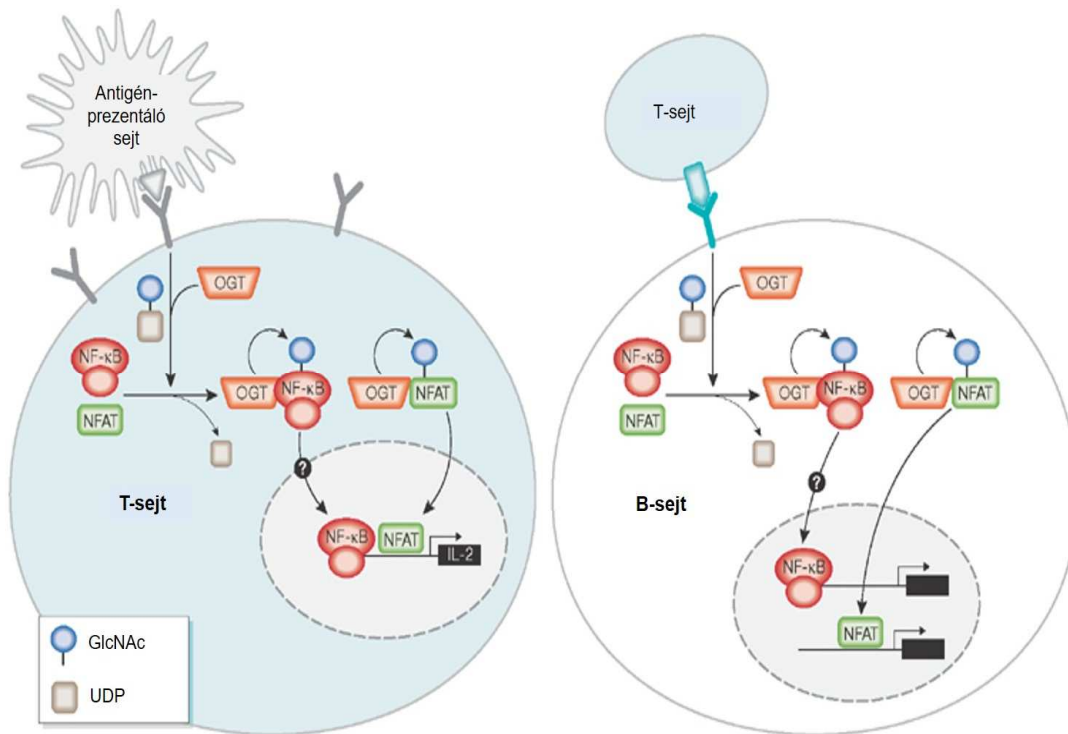
Az iszkémiás prekondicionálással ellentétben, a fizikai aktivitás általi prekondicionálás és O-glikoziláció kapcsolatát csak korlátozott számú állatmodellben tanulmányozták ellentmondásos eredményekkel. Hosszú távú, rendszeres edzés hatásait vizsgálva rágcsálók szív- és izomszöveteiben néhány kutatócsoport O-glikoziláció csökkenést [98,99], míg mások O-glikoziláció szint emelkedést találtak [100,101]. Az akut fizikai aktivitás és O-glikoziláció kapcsolatával ez idáig két tanulmány foglalkozott. Peternelj és mtsai emelkedett O-glikozilációs szinteket mutattak ki a patkány vázizomban akut edzést követően [102]. Ezzel szemben Medford és kutatócsoportja egerek szívizomszövetében vizsgálva az akut testedzés hatásait, arra következtetésre jutott, hogy 15 perces futópados edzés után az O-glikoziláció szintje csökkent, míg félórás edzés után nem tapasztaltak szignifikáns változást [103].

A rendelkezésre álló adatokból jól kitűnik, hogy a fizikai aktivitás általi prekondicionálás és O-glikoziláció közötti molekuláris kapcsolat megértése további kísérleteket végzését teszi szükségessé.

I.4. O-GLIKOZILÁCIÓ ÉS FIZIKAI AKTIVITÁS SZEREPE AZ IMMUNRENDSZER MŰKÖDÉSÉBEN

Irodalmi adatok sokasága támasztja alá a glikoziláció relevanciáját a kórokozók felismerésében, gyulladásos folyamatokban, veleszületett és szerzett immunválaszokban és a daganatos megbetegedésekben [104–107]. A glikozilációnak kulcsszerepe van a fehérje-antigén felvételben és a proteolitikus folyamatokban, megváltoztatva a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) antigén prezentációját és így a későbbi immunválaszt is. Az MHC-ligandumok körülbelül egyharmada az epitópok poszt-transzlációs módosítását tartalmazza. Mivel a fehérjék közös poszt-transzlációs módosulása a glikoziláció, ezáltal valószínűsíthető, hogy az MHC ligandumok 1-5% tartalmazhat glikánokat. Az elmúlt években egyre több tanulmány foglalkozott a glikánok és T-sejt válaszok közötti kapcsolattal, bebizonyítva, hogy a glikánok befolyásolhatják a T-sejt-válaszokat akár az epitóp szerkezetének változtatása révén, akár az antigén prezentáló sejtek által bemutatott peptid epitópok profiljának befolyásolásával. A glikánok szerepe az antigén és a T-sejtek felismerésében ugyanakkor különösen fontos a saját antigének toleranciájának indukálásához, ugyanis az epitóp megváltozása számos autoimmun betegséghez kapcsolódhat.[108,109].

Az O-glikoziláció a többi „hagyományos” glikációval ellentétben nem elsősorban az antigén szerkezet kialakításában játszik szerepet - fontosabb az intracelluláris folyamatokban betöltött szabályozó szerepe. Az O-glikoziláció immunrendszerben betöltött szerepét főként limfocita sejtekben vizsgálták már az 1990-es években. Kearsé és Hart kimutatták, hogy a T-sejteket mitogén hatású konkanavalin A, majd forbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA) / ionomicin kezelésnek alávétve a nukleáris és citoplazmatikus O-glikozilációs fehérjékben gyors és átmeneti változás következett be bizonyítva az O-glikoziláció szabályozó szerepét a T-limfocita aktiválás korai stádiumában [110]. Körülbelül egy évtizeddel később, James és mtsai a NF- κ B transzkripciós faktor átmeneti O-glikozilációs módosítását írták le [9]. Egy másik fontos limfocita transzkripciós faktorról, az NFAT-ról is igazolódott, hogy tartalmaz O-glikozilációs módosítási helyeket. Ennek a két faktornak az O-glikozilációs módosulása révén valósul meg T-sejt-receptoron (TCR) keresztül a T-sejt valamint azon belül a T-sejt osztódást serkentő faktor, interleukin-2 (IL-2) és IL-6 aktiválása. Igazolódott továbbá, hogy a NFAT és NF- κ B nukleáris lokalizációja kulcsfontosságú a B-sejtek újra-programozásában valamint a B-sejt aktivációban is [111] (**4. ábra**).



4. ábra. O-glikozilációs módosulás modellje a limfocita aktiválás során. (Módosított ábra)
(Kép forrása: Alexander Golks A, Guerini D (2008) EMBO Reports. 9(8): 748-753)

Citokinek általi stimuláció különböző anyagcsere folyamatok változását eredményezve valószínűleg a HBP-be belépő cukor mennyiségét is érinti. Emelkedett UDP-GlcNAc a fehérjék O-glikozilációs módosulásához vezet, mely a monociták és neutrofilek migráló és proliferáló funkcióira van hatással [112].

A fizikai aktivitás immunrendszerre gyakorolt hatása széles körben tanulmányozott terület. Egyfajta fizikai stresszként olyan immunválaszokat okozhat, amelyek a testedzés természetétől, intenzitásától és tartamától függően lehetnek pozitív (védő), negatív (patológiás) vagy immunmoduláló hatásúak [113,114]. Mérsékelt intenzitású testmozgásról bebizonyosodott, hogy fokozza az immunrendszer működését, csökkenti a felső légúti fertőzés kialakulását. Ezzel szemben a hosszabb ideig végzett megerőltető testmozgás az immunrendszer működésének átmeneti depressziójához vezethet [115,116]. Handzik és mtsai ugyanakkor kimutatták, hogy a nagy intenzitású testmozgás fokozottabb gyulladáscsökkentő válaszreakciót eredményezhet, mely kedvezőbb hatással bír a krónikus gyulladással járó betegségek megelőzésében és kezelésében, például szív- és érrendszeri betegségeknél [117]. A fizikai aktivitással szembeni sejtválasz a természetes ölüsejt (NK-sejt) aktivitás, a neutrofil funkció és

a limfocita válasz révén figyelhető meg [113]. Niemann és mtsai NK sejtek fokozott citotoxikus aktivitását mérték maratoni futóknál mozgásszegény kontrollcsoporthoz viszonyítva [118]. A NK sejtekkel ellentétben, úgy tűnik, a testmozgás csökkenti a veleszületett immunrendszer egyik összetevőjének, a neutrofil sejteknek működését. Hack és mtsai a neutrofilek fagocitáló tulajdonságainak csökkenését mutatták ki sportolóknál intenzív edzést követően [119]. Bizonyított, hogy ezeknek a hatékony fagocitáknak az elnyomása döntő szerepet játszik a légzőszervi megbetegedések kialakulásában. A szerzett immunrendszer esetében azonban nem találtak egyértelmű összefüggéseket a közvetlen testmozgás és a limfocita válasz között, annak ellenére, hogy a T-sejtek működése egy intenzív futás után több órán keresztül felfüggesztődik [120].

Bár jól látszik, hogy számos tanulmány foglalkozik az immunrendszer és O-glikoziláció valamint az immunrendszer és fizikai aktivitás kapcsolatával, arra vonatkozó adatok nincsenek, ahol az immunrendszer, az O-glikoziláció és a fizikai aktivitás kapcsolatát egységesen tárgyalnák.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozat célja az O-glikoziláció akut stresszben betöltött szerepének tanulmányozása volt kétféle modellben.

1. Első lépésben humán neuroblasztóma sejtvonalon akut stresszként hidrogén-peroxidos kezelést alkalmazva a következőket vizsgáltuk:

- *Rövid ideig oxidatív stressznek kitett humán neuroblasztóma sejtekben az O-glikoziláció dinamikájának követése különböző regenerációs periódusokban.*
- *O-glikoziláció és tau foszforiláció közötti kölcsönhatás vizsgálata akut stresszt követően.*
- *O-glikoziláció folyamatában szerepet játszó főbb enzimek mRNS expressziós szintjének meghatározása.*

2. Második lépésben rövid ideig tartó fizikai aktivitás és O-glikoziláció hatását vizsgáltuk humán vérmintákon. Ennek céljából a következő lépéseket végeztük:

- *Testedzés során szignifikáns eltérést mutató biokémiai anyagok detektálása.*
- *Humán vérmintából izolált fehérvérsejtek O-glikozilációs státuszának változása akut testedzést követően.*
- *Fehérvérsejt alpopulációk O-glikozilációs módosulásának detektálása.*

III. ANYAG ÉS MÓDSZER

III.1. SEJTKULTÚRÁK

Kísérleteinket kitapadó SH-SY5Y (ATCC CRL-2266 humán neuroblasztóma) és szuszpenzióban lévő Jurkat (ATCC TIB-152 humán T-sejt leukémia sejtek) sejtvonalakon (forrás PTE Immunológiai és Biotechnológia Intézet) végeztük. A sejtek fenntartásához és tenyésztéséhez EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) és Ham's F12 médiumok 1:1 arányú keverékét használtuk, kiegészítve 10% főtális szarvasmarha szérummal (FBS), 1% nem esszenciális aminosav keverékkel (NEAA) illetve penicillin (100 U/ml) - sztreptomycin (100 µg/ml) oldattal.

A sejteket standard sejtenyésztési körülmények között (37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó, párasított atmoszférájú termosztátban) tenyésztettük. Médiumcsere történt 2-3 naponta a megfelelő sejtkonfluencia illetve sejt mennyiség eléréséig.

III.1.1. Hidrogén-peroxidos kezelés

A SH-SY5Y sejteket 80%-os konfluencia elérésekor, a kísérlet kezdete előtt 12-24 órával, friss médiumba helyeztük. Célunk volt egy olyan akut oxidatív stresszállapot és azutáni regeneráció szimulálása, mely során a sejtek nem szenvedtek túlzott mértékű apoptózist/nekrózist. A szakirodalomnak megfelelően [121] és számos előkísérlet alapján az általunk használt sejtvonalon a 0,5 mM H₂O₂-dal 30 percig való kezelés bizonyult optimálisnak, elérve így egy ~75%-os viabilitás csökkenést. A sejteket a FBS-ben található antioxidánsok okozta gyors H₂O₂ lebomlásának elkerülése végett szérummentes médiumban helyeztük az említett kondíciók között. A kezelés lejárta után a sejteket 1 alkalommal mostuk foszfát pufferelt sóoldatban (PBS), majd komplett médiumba visszahelyezve a feltüntetett regenerációs időpontokig inkubáltuk: 0, 30, 60 percig, és 2, 4, 24, 48, és 72 óráig. A kontroll sejteket hidrogén-peroxidos kezelés nélkül 30 percen át szérummentes médiumban tartottuk, majd 60 percig komplett médiumba helyeztük vissza. Az inkubációs periódusok lejárta után a sejteket PBS oldatban mostuk, majd pelletként -76°C-on tároltuk.

III.1.2 Intracelluláris reaktív oxigén szabadgyök meghatározás

Intracelluláris ROS szintek mérését CM-H2DCFDA (Thermo Fisher Scientific) fluoreszcens festékekkel végeztük, ami egy általános oxidatív stressz indikátor. SH-SY5Y sejteket a kísérlet megkezdése előtt 0,25%-os tripszint, 0,5 mM etiléndiamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó PBS oldatba vettük fel, majd előmelegített komplett médiumba mostuk, semlegesítve a tripszint. Ezután a sejteket gyorsan Hanks pufferelt sóoldatban (HBSS) mostuk, majd újra felvettük 1% szarvasmarha szérum albumint, 1,2 mM Ca^{2+} -t, 1 mM Mg^{2+} -t és 2 mM CM-H2DCFDA festéket tartalmazó HBSS oldatba. A mintákat sötétben szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, miközben minden 10. percben óvatosan megkevertük a sejtek kitapadásának elkerülése végett. További mosási lépésekkel eltávolítottuk a felesleges fluoreszcens festéket, majd a sejteket ismét HBSS oldatba szuszpendáltuk. A fluoreszcens jelet 25°C-on F4500 fluoreszcens spektrofotométerrel (Hitachi High-Technologies) detektáltuk 490 nm gerjesztési és 525 nm emissziós hullámhosszon. A fluoreszcens alapvonalat 1xPBS illetve 0,5 mM H_2O_2 hozzáadása előtt körülbelül 1 percig rögzítettük. Magát a fluoreszcens jelet kb. 10 percig monitoroztuk a kontroll mintában és a hidrogén-peroxidos kezelést követően. A relatív ROS értéket a fluoreszcencia intenzitás változás hányadosával (F/F_0) fejeztük ki.

III.1.3 Jurkat sejtek kezelése

EMEM és Ham's F12 médiumban tenyésztett Jurkat sejteket az alábbi módon kezeltük 1 órán át: *a*) edzés előtti és edzés utáni humán szérummal, *b*) 5, 10, 20 mM tejsavval (PTE Gyógyszertár), valamint *c*) 1 μM , és 100 μM epinefrinnel. Citokinek közül az IL-6 3, 5, 50, 100, 1000 pg/ml koncentrációjú inkubációját végeztük 1 és 6 órán át. Az inkubációs idők lejártá után a sejteket PBS oldatos mosást követően pelletként a feldolgozásukig -76°C-on tároltuk.

III.2. KÍSÉRLETI EDZÉS ÖNKÉNTESSEKKEL

Ehhez a kísérlethez olyan egészséges férfi önkénteseket kértünk fel, akik megfeleltek a kiválasztási kritériumainknak, melyet az **1. táblázat** foglal össze és az önkéntesek főbb paramétereit is tartalmazza (pl. életkor, testtömeg). A résztvevők írásbeli tájékoztatást kaptak a kísérlet részleteiről, a mintavételről és a vizsgálati protokollról, majd írásos beleegyezésüket adták a kísérleti feltételekhez.

Előkísérletként 3 egészséges férfi önkéntest kértünk fel 2 mérföldes táv lefutására, melyet megelőzőt illetve követett egy-egy vérvétel. A 2 mérföldes távot az önkéntesek az Egyesült Államok Hadseregének Fizikai Alkalmassági Teszt leírásának megfelelően teljesítették [122]. Következő alkalommal standard reggeli mellett (ami ~600kcal-nak felelt meg, és 80% szénhidrátot tartalmazott) 6 egészséges férfi önkéntessel ismételtettük meg a feladatot. A kísérletet ebben az esetben két, majdnem azonos részre osztottuk: 1. *nyugalmi periódus* és 2. *testedzés*. A két rész között 3 hét telt el. Mindkét esetben az önkéntesek 12 órás éhgyomri vérvételen vettek részt illetve tilos volt bármilyen megerőltető testmozgás 48 órával a vérvétel előtt. A *nyugalmi periódus*ban a standard reggeli elfogyasztása után 3 órával az önkéntesek fizikai aktivitás nélkül egy második vérvételen vettek részt. A *testedzési részben* az önkénteseknek a reggeli elfogyasztása után 3 órával 2 mérföldes futó gyakorlatot kellett teljesíteniük minél rövidebb idő alatt, megállás nélkül, melyet egy újabb vérvétel követett.

Jellemzők	n = 6
Kor (éves)	30 ± 5,2
Testtömeg (kg)	77 ± 8,6
Testtömegindex (kg/m ²)	23,94 ± 2,3
Dohányzás	0 (0%)
Akut/krónikus betegség	0 (0%)
Rendszeres gyógyszeresedés	0 (0%)
2 mérföldes futás (időtartam)	940 ± 85 s.
Rendszeres testedzés/hét, (időtartam)	119 ± 88 min.

1. táblázat. Az önkéntesekhez tartozó főbb adatok és a kiválasztás kritériumai.

III.2.1. Humán vérminták feldolgozása

Az önkéntesek vérmintáit zárt vérvételi rendszerű (Becton Dickinson Vacutainer®) géltartalmú natív illetve kálium- etiléndiamin-tetraecetsavval (K-EDTA) valamint nátrium-fluoriddal (NaF) ellátott vákuum-csővekbe gyűjtöttük. A minták gyűjtése a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával, az 5187 számú etikai engedéllyel történt. K-EDTA alvadásgátolt csövekből végeztük a vérkép meghatározást Cell-Dyn 3700 hematológiai automatán (Abbott Diagnostics), valamint a fehérvérsejtek izolálását. Glükóz és laktát meghatározására NaF-t tartalmazó csöveket használtunk, megakadályozva így a glikolízist. Géltartalmú natív csövekből rutin laborvizsgálatokat végeztünk, meghatározva így az ionháztartást, vese és májfunkciós paramétereket, anyagcsere és szövetkárosodási folyamatokat. A levett vérmintákat 10 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten 1500 rcf-n, natív csövekből szérumot illetve NaF-t tartalmú csövekből plazmát nyerve. Mind a plazmából, mind a szérumból vizsgált paramétereket Cobas 8000 Modular készüléken mértük (Roche Diagnostics).

Mononukleáris sejtek izolálására megközelítőleg 2,5 ml K-EDTA-val antikoagulált teljes vért használtunk, amelyet gyűjtés után rögtön Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) oldatra rétegeztünk. Izopiknikus grádiens centrifugálás (20 percig, szobahőmérsékleten, 500 rcf-n) után a mononukleáris sejteket a plazma és Histopaque-1077 határfelületről gyűjtöttük össze és jéghideg PBS oldatos mosást követően pelletként a felhasználásig -76°C -on tároltuk.

III.3. WESTERN BLOT

Western blot vizsgálatainkhoz előkezelt SH-SY5Y és Jurkat sejteket, valamint izolált humán mononukleáris sejteket felolvasztás után jégen tartott módosított RIPA pufferben (10 mM Tris (pH=7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 1% Triton X-100, 10% glicerol, 0,1% SDS, 0,5% deoxikolát, proteáz gátló koktél: 1 tabletta/10ml (Roche Applied Science) tártuk fel. A mintákat 30 perces inkubálást követően 10 percig, 4°C -on 3000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk. A felülúszó protein koncentrációjának meghatározását a Bio-RAD DC Protein Assay Kit-jével végeztük. A lizátumokat Laemmeli-pufferrel kiegészítve (4x törzsoldat: 0,25M Tris-HCl, pH 6,8, 40v/v% glicerol, 27,74 mM SDS, 8v/v% β -merkapto-
etanol, 0,01v/v% brómfenolkék) 5 percig forraltuk. Elektroforetikus elválasztásra 8% SDS-PAGE gélt használtunk, majd a mintákat polivinil-difluorid (PVDF) membránra (Millipore)

blottoltuk. A minták egyenlő mennyiségű protein tartalmát SYPRO Ruby Protein Blot Stain Kit-jével (Bio-Rad) ellenőriztük. A membránokat egy órán át blokkoltuk 1%-os kazeines PBS oldatban illetve 5%-os zsírmentes tejpört tartalmazó trissel tompított sóoldat + 0,1%-os Tween 20 keverékében szobahőmérsékleten, majd ezt követően O-glikozilált fehérjékre specifikus, CTD110.6 (monoklonális egér IgM, 1:2000, Sigma-Aldrich) és RL2 (monoklonális egér, IgG, 1:1000, Thermo Fisher Scientific) antitesttel jelöltük. A tau fehérjék kimutatására többféle tau elleni antitestet használtunk a gyártók által javasolt protokoll szerint, melyet a **2. táblázat** foglal magába. A mononukleáris sejtek illetve Jurkat sejtek esetében belső kontrollnak 1:1500 hígításban poliklonális anti-aktin IgG (Sigma-Aldrich) antitestet használtunk. Végül a membránokat a megfelelő, tormagyökér peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel (1:2500) inkubáltuk. Femto kemilumineszcens szubsztráttal (Thermo Fisher Scientific) végeztük az előhívást, a jeleket Kodak Image Station 2000R-rel detektáltuk. A sávok intenzitásának elemzését Kodak 1D és ImageJ elemző szoftverrel végeztük.

Tau elsődleges antitestek	Hígítás	Gyártók
monoklonális egér anti-total tau	1:250	Thermo Fisher Scientific
[Ps ¹⁹⁹] foszfospecifikus poliklonális nyúl anti-tau	1:1000	Thermo Fisher Scientific
[Ps ²⁶²] foszfospecifikus poliklonális nyúl anti- tau	1:1000	Abcam, Cambridge, MA, USA
PHF1 [Ps ^{396/404}] anti-tau	1:200	Dr. P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA

2. táblázat. A kísérlet során használt tau elleni antitestek jellemzői.

III.4. SEJTVIABILITÁS

SH-SY5Y sejteket a kezelési és a regenerációs időpontok lejárta után 0,25%-os tripszinnel a tenyésztő flaskákról enzimatikusan eltávolítottuk. Kétszeri jéghideg PBS-sel mosott, körülbelül 10^6 sejtet tartalmazó mintákat propidium-jodiddal és Annexin V-FITC-vel festettük a gyártó utasításai szerint (BD Pharmingen). A propidium-jodid gerjesztette fluoreszcens jelet a FL3 csatornán, 620 nm hullámhosszon, míg az Annexin V-FITC intenzitását az FL1 csatornán, 525 nm hullámhosszon detektáltuk Cytomic FC 500 áramlási citométerrel (Beckman Coulter). Az elpusztult (propidium-jodidra pozitív és Annexin V-FITC negatív vagy pozitív sejtek) illetve az élő sejtek (propidium-jodid és Annexin V-FITC negatív) kapuzásának beállítása kontroll mintákon történt, majd ezeket a határokat alkalmaztuk minden egyes mintánál.

III.5. IMMUNFLUORESCENCIA

SH-SY5Y sejteket ~80%-os konfluencia eléréséig fedőlemezekon tenyésztettünk. Oxidatív kezelést követően a sejtet tartalmazó fedőlemezeket kétszer mostuk jéghideg PBS oldatban, majd 10%-os formaldehid tartalmú PBS-ben fixáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. Formaldehid okozta autofluoreszcencia elkerülésére a sejteket 50 mM ammónium-kloriddal kezeltük 10 percig. Ezután a sejteket 0,1% Triton-X 100/PBS oldatban 5 percig permeabilizáltuk. A nem specifikus kötődési helyeket PBS-ben oldott 5%-os marha szérum albuminnal (BSA, Sigma-Aldrich) gátoltuk 5 percig. Az elsődleges ellenanyaggal való jelölés CTD110.6 (1:200) 5% BSA/PBS oldatban történt 30 percig szobahőmérsékleten. Háromszori PBS-sel történő öblítés után a mintákat Alexa Fluor 594 kecske anti-egér IgM másodlagos antitesttel (1:200, Thermo Fisher Scientific) jelöltük 30 percig sötétben. A magvak láthatóvá tételére Hoechst festést alkalmaztunk 1:5000 hígításban 15 percig szobahőmérsékleten, sötétben. PBS oldatban való mosás után a fedőlemezeket Vectashield fedőoldattal (Vector Laboratories) zártuk. A képeket Zeiss Axiovert 35 (Carl Zeiss Microscopy) inverz fluoreszcens mikroszkóppal készítettük, a képelemzést CellD (Olympus) szoftverrel végeztük. Az átlagos pixelintenzitást legkevesebb 15 sejtől gyűjtött és Hoechst magfestésre normalizált értékből számítottuk ki.

III.6. VALÓS IDEJŰ POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

Hidrogén-peroxiddal kezelt SH-SY5Y neuroblasztóma sejtekből totál RNS-t izoláltunk RNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével a gyártó utasításait követve. Az így nyert RNS koncentrációját és minőségét Nanodrop Implen Nanophotométerrel határoztuk meg. A koncentrációmérést követően 1µg mennyiségű totál RNS-t felhasználva cDNS-t készítettünk iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) felhasználásával a gyártó által javasolt protokoll szerint. Előretervezett Taq-Man próbát alkalmaztunk a humán OGT és L-glutamin-D-fruktóz 6-foszfát amidotranszferáz (GFAT) mRNS expressziós szintjeinek meghatározására. Referencia génként humán porfobilinogén deaminázt (PBGD) használtunk. A primerek és próbafragmensek megtervezéséhez a ProbeFinder szoftvert használtuk (www.universalprobelibrary.com). A valós idejű polimeráz láncreakció (RT-PCR) egyes lépéseit a **3. táblázat** foglalja össze.

RT-PCR lépései		Hőmérséklet	Időtartam
I. Előinkubálás		95°C	10 min
II. Amplifikáció (ciklusszám: 45)	Denaturálás	95°C	12s
	Anelláció	60°C	30s
	Elongáció	72°C	1s
III. Hűtés		40°C	30s

3. táblázat. RT-PCR lépései.

A mérést LightCycler II Thermal Cycler (Roche Applied Science) készülékkel végeztük. Minden reakcióelegyhez LightCycler Taqman Master Mix-t adtunk 20µl osztérfogatban. Az amplifikáció hatékonysága mind a cél-, mind a referencia gén esetében megközelítőleg 100%-os volt. A relatív génexpresszió meghatározásához a 2DDCt (Livak) módszert használtuk. Minden esetben a vizsgált gén expressziós szintjét összehasonlítottuk a referencia gén expressziós szintjével. A PCR reakciók során használt oligonukleotidok szekvenciáit és próbáit a **4. táblázat** tartalmazza.

Célgén	Forward primer	Reverz primer	Próba
OGT	5'-AGACGATGGCACAAACTTCC-3'	5'-ATCAGCTGCTTTTCCATTGC-3'	UPL#29
GFAT	5'-TGAGATTGGTGTGGCCAGTA-3'	5'-GGCAAACATCACAAGGGATAC-3'	UPL#20
PBGD	5'-TGCCAGAGAAGAGTGTGGTG-3'	5'-AGCCGGGTGTTGAGGTTT-3'	UPL#24

4. táblázat. A felhasznált oligonukleotidok szekvenciái.

III.7. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA

Közvetlenül a K-EDTA-val antikoagulált teljes vér gyűjtése után, fehérvérsejtek kinyerése végett a vérmintákat egyidőben Lyse/Fix pufferrel (BD Biosciences) lizáltuk és fixáltuk a gyártó utasításai szerint. A fixált fehérvérsejteket PBS oldatos mosás után 0,5% Triton-X 100/PBS oldattal 2 percig permeabilizáltuk. Nem specifikus kötőhelyek blokkolására 5% BSA/PBS oldatot használtunk 2 percig. Az elsődleges antitesttel való inkubálás RL2 (1:200) 5% BSA/PBS oldatban 37°C-on 30 percig történt. PBS-ben történő öblítés után a sejteket 1:200 hígítású fluoreszcinnel konjugált kecske anti-egér IgG (Thermo Fisher Scientific) másodlagos antitestet tartalmazó 5% BSA/PBS oldatban inkubáltuk 37°C-on 30 percig. Végül mosás után, a sejteket mérés előtt PBS oldatba újra szuszpendáltuk. A sejtek előre- (FSc) és oldalirányú (SSc) fényszóródását valamint a fluoreszcens intenzitást (FL1-es csatornán, 525 nm-en detektálva) Cytomics FC 500 áramlási citométerrel (Beckman Coulter) mértük. A különböző fehérvérsejt alpopuláció régiók és az adatok mennyiségi meghatározása FlowJo szoftver alkalmazásával történt.

III.8. STASZTISZTIKAI ELEMZÉS

Az ábrázolt értékeket az átlag \pm standard szórás (SD) illetve az átlag \pm standard hiba (SEM) formájában tüntettük fel. A statisztikai elemzést Student-féle T-próbával, az összehasonlításokat kétutas ANOVA-t követő Bonferroni *post-hoc* teszttel végeztük. Minden esetben $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

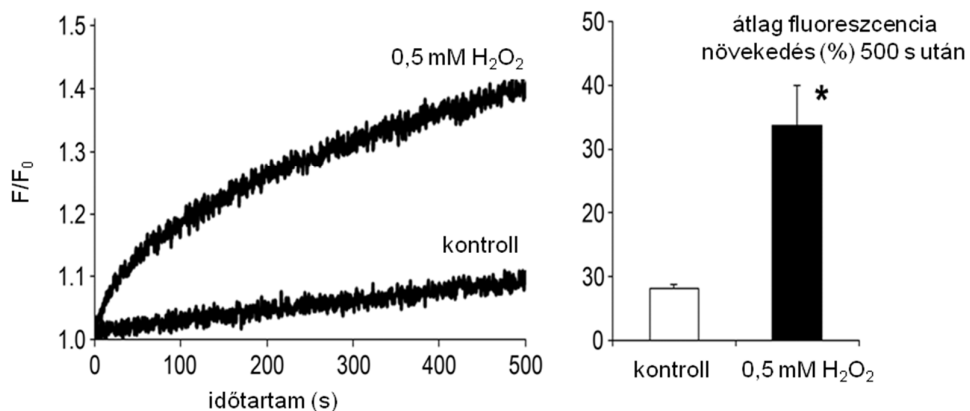
IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

IV.1. AKUT STRESSZ HATÁSA AZ O-GLIKOZILÁCIÓRA NEUROBLASZTÓMA SEJTVONALON

IV.1.1 EREDMÉNYEK

IV.1.1.1. Oxidatív kezelés hatása az SH-SY5Y sejtek viabilitására

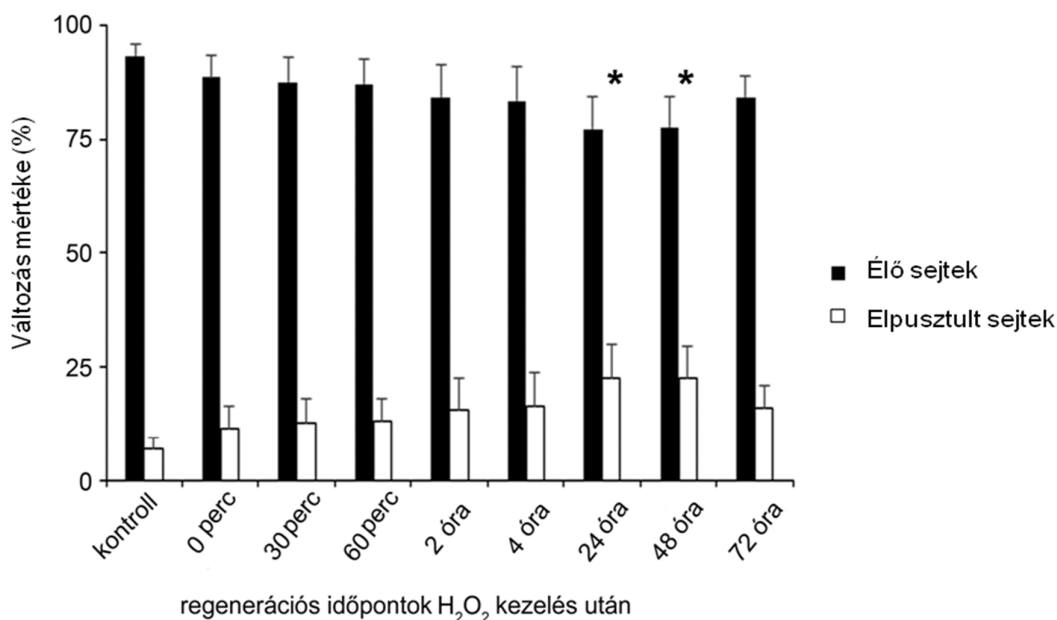
A SH-SY5Y neuroblasztóma sejteket oxidatív stressz elérése érdekében H_2O_2 kezelésnek vetettük alá. A 30 percig tartó 0,5 mM H_2O_2 kezelés hatásosságának mérésére CM-H2DCFDA ROS specifikus fluoreszcens festéket használtunk. Amint az **5. ábrán** is látható peroxidos kezelést követően szignifikánsan emelkedett intracelluláris ROS aktivitást mértünk.



5. ábra. Intracelluláris ROS aktivitás mérése. **Bal oldal:** relatív fluoreszcencia (F/F_0) detektálása idő függvényében. **Jobb oldal:** hidrogén-peroxidos kezelés utáni átlagos fluoreszcencia növekedés. Az adatok három független kísérlet átlagai \pm S.E.M. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest.

Akut oxidatív stressz és azt követő regeneráció szimulálására a 30 percig 0,5 mM H_2O_2 kezelésnek kitétt neuroblasztóma sejteket a szer kimosása után komplett médiumba helyeztük vissza regeneráció céljából (**6. ábra.**). Intracelluláris ROS szinteket a H_2O_2 eltávolítása után

különböző időpontokban (1-6 óra) is megmértük, de releváns különbségeket nem találtunk a peroxiddal kezelt és kontroll sejtek között. Ellenben az oxidatív stressz okozta károsodás főként a kezelés utáni 24 óra elteltével volt kifejezett (az elpusztult sejtek aránya a kontroll mintában lévő elpusztult sejtekhez képest 6,3%-ról 22,6%-ra emelkedett). Ez az arány 48 illetve 72 óra elteltével nem mutatott további szignifikáns emelkedést.

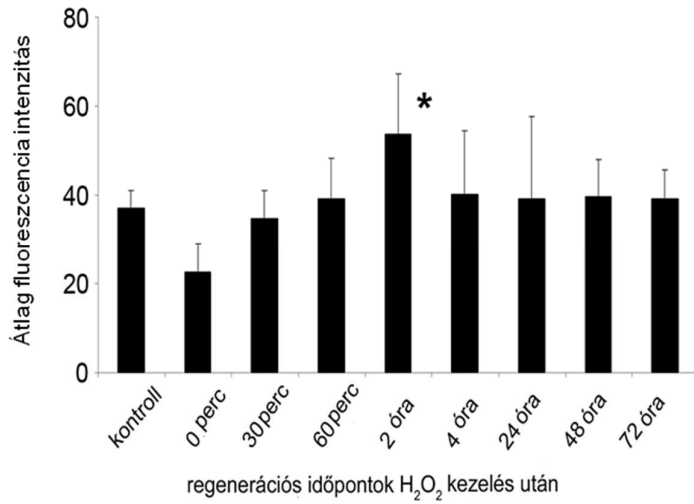
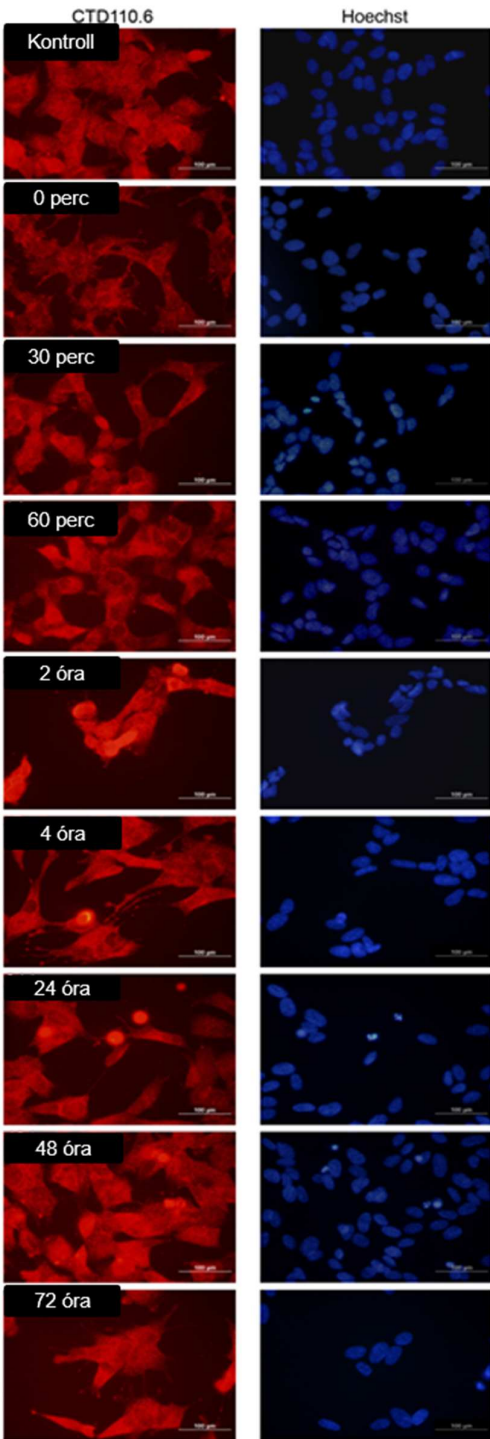


6. ábra. Akut oxidatív stressz hatása a sejtek viabilitására. H₂O₂-os kezelés után az élő és elpusztult sejtek százalékos arányának megállapítása Annexin V és propidium-jodidos jelölést követően áramlási citométerrel történt. Az adatok nyolc független kísérlet átlagai ±S.E.M. **p* < 0,05 a kontrollhoz képest.

IV.1.1.2. O-glikoziláció dinamikájának változása immunfluoreszcenciával akut oxidatív stresszben

A neuroblasztóma sejtek viabilitására kifejtett 30 percig tartó hidrogén-peroxidos kezelés okozta akut oxidatív stressz hatását a továbbiakban az O-glikoziláció dinamikájában is megvizsgáltuk. Ismerve az O-glikoziláció celluláris stresszválaszban és sejtciklusban betöltött szerepét, feltételeztük, hogy az O-glikoziláció dinamikájában is észlelünk változásokat. Fedőlemezen tenyésztett kontroll valamint 0,5 mM H₂O₂-vel 30 percig kezelt SH-SY5Y sejteket a különböző regenerációs periódusok után formalinban rögzítettük, majd CTD110.6

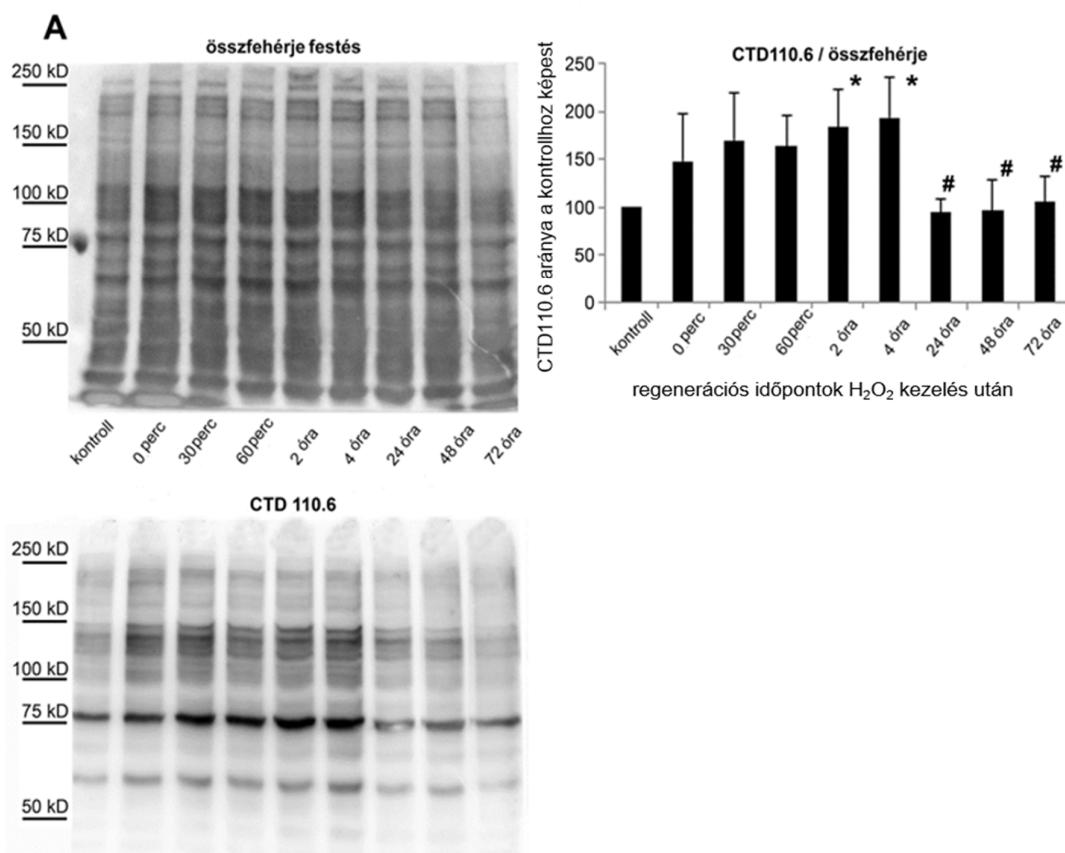
(anti-O-glikozilációs monoklonális) antitesttel jelöltük. A másodlagos immunfluoreszcens jelölés után a neuroblasztóma sejtek citoplazmája diffúzan, bőséges szemcsés O-glikozilációs pozitívítást mutatott (**7. ábra**). Bár oxidatív stressz hatására minden sejtben emelkedett O-glikozilációs szintet találtunk, a szignifikáns változásokat a regenerációs periódus előrehaladásával észleltük. A néhány erőteljesebben jelölődött, kompaktabb, kör alakú sejtek esetében Hoechst magfestés alapján felmerült a mitotikus és az apoptotikus jelleg is. A késői stressz fázisban észlelt nagy számuk miatt apoptotikus jellegük valószínűsíthetőbb volt. A fluoreszcencia intenzitást minden kísérleti körülményre átlagoltuk és a **7. ábra** jobb oldalán látható oszlopdiagramon összesítettük. Bár nem találtunk jelentős intenzitásbeli különbséget a kontroll és a különböző regenerációs időpontban feldolgozott sejtek között, szignifikáns változást észleltünk a 0 perces illetve a 2 órás regenerációs időpont közt.



7. ábra. Akut oxidatív stressz hatása fehérje O-glikoziláció időbeli dinamikájára immunfluoreszcens jelöléssel. Kontroll és a H₂O₂ kezelésen átesett sejteket CTD110.6 antitesttel és Hoechst magfestéssel jelöltük. **Bal oldal:** oxidatív stressz utáni regenerációs időpontokban készült képek ábrázolása (40x nagyítás). **Jobb oldal:** immunfluoreszcens képek mennyiségi elemzése. Az átlagos pixelintenzitás legkevesebb 15 sejtől gyűjtött és Hoechst magfestésre normalizált érték, az adatok három független kísérlet átlagai \pm S.E.M; * $p < 0,05$ a 0 perchez képest.

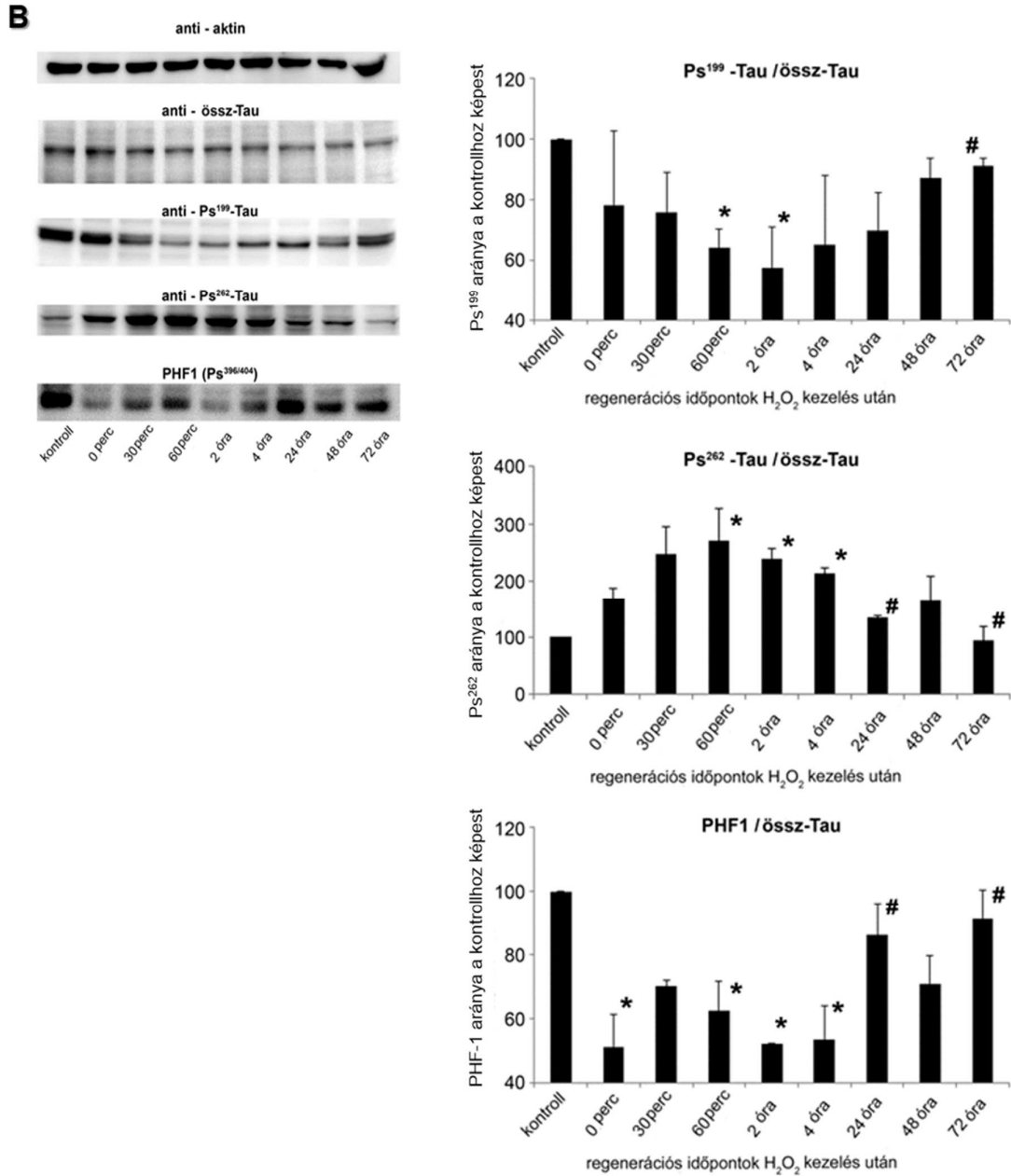
IV.1.1.3. O-glikoziláció és foszforiláció kapcsolatának vizsgálata SH-SY5Y neuroblasztóma sejteken

Az immunfluoreszcenciával bemutatott dinamikus O-glikozilációs változást a továbbiakban Western blottal is igazoltuk, azáltal, hogy a fehérjéket CTD110.6 anti-O-glikozilációs antitesttel jelöltük. Szignifikánsan emelkedett O-glikozilációs intenzitást találtunk 2-4 órával az oxidatív stresszt követően, mely 24-48 óra elteltével közel normál szintre tért vissza (8A. ábra).



8A. ábra. Akut oxidatív stressz utáni SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek O-glikozilációs mintázatának időbeli változása Western-blottal. **Bal oldal:** H₂O₂-vel kezelt neuroblasztóma sejtek Western-blot analízise SYPRO Ruby Blot összfehérje festés valamint CTD110.6 antitest alkalmazása utána. **Jobb oldal:** denzitometriás ábrázolása az O-glikozilációs mintázatnak az összfehérje festésre normalizálva. A változásokat a kontrollhoz viszonyított arány %-ában fejeztük ki. Az adatok három független kísérlet átlagai \pm S.E.M; * $p < 0,05$ kontrollhoz képest, # $p < 0,05$ 2 órás regenerációs ponthoz képest.

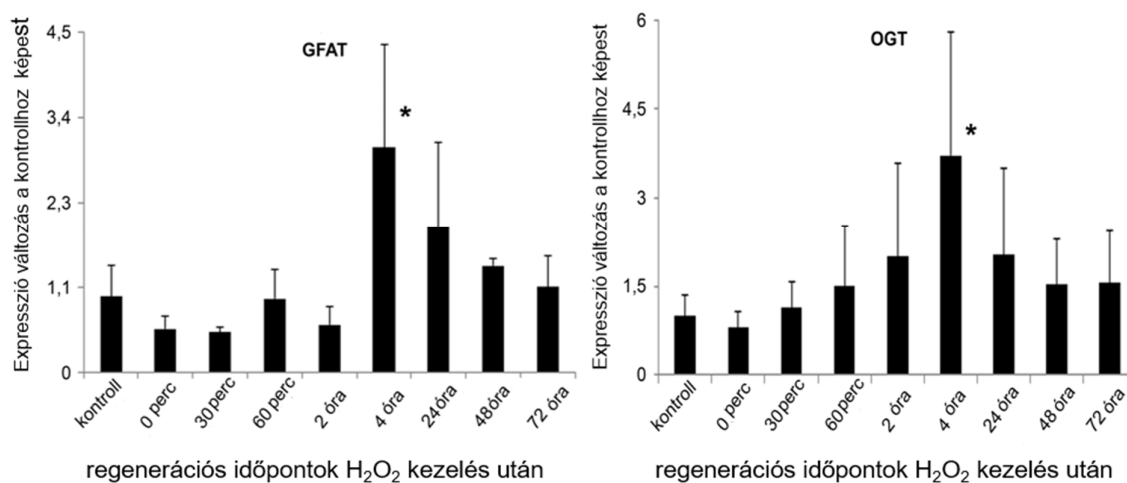
A **4. táblázat**ban feltüntetett tau fehérje elleni antitestekkel vizsgáltuk az eltérő regenerációs periódusokban gyűjtött előzetesen hidrogén-peroxiddal kezelt neuroblasztóma sejtek tau foszforilációjának szintjét. Amint a **8B. ábra** eredményei is mutatják, a foszfospecifikus [Ps¹⁹⁹] és PHF1 tau fehérje szintek az össz-tau fehérje szinthez viszonyítva jelentősen csökkentek a 30 percig tartó oxidatív stressz után. A kezelés utáni 24-72 órás regenerációs időpontokban ezen tau fehérjék foszforilációs szintje az O-glikozilációval ellentétes dinamikát mutatva, visszatért az alapszintre. A foszfospecifikus [Ps²⁶²] tau fehérjék esetében eredményeink az O-glikozilációval megegyező dinamikát mutattak, oxidatív stressz után a rövid időn belül jelentkező foszforiláció emelkedést csökkenés kísérte a hosszabb távú regenerációs periódus alatt.



8B. ábra. Tau foszforiláció időbeli változása oxidatív stressz hatására. **Bal oldal:** Western blot analízis aktin, össz-tau, [Ps¹⁹⁹], [Ps²⁶²] és PHF-1 antitest jelölés után kontroll és előzetesen 30 percig H₂O₂ kezelésnek kitétt majd különböző regeneráció időpontokban összegyűjtött SH-SY5Y sejtekből származó fehérjekivonatokból. **Jobb oldal:** [Ps¹⁹⁹], [Ps²⁶²] és PHF1 denzitometriás elemzése össz-tau-ra normalizálva. A változásokat a kontrollhoz viszonyított arány %-ában fejeztük ki. Az adatok három független kísérlet átlagai ± S.E.M; **p* < 0,05 kontrollhoz képest, #*p* < 0,05 2 órás regenerációs ponthoz képest.

IV.1.1.4. GFAT és OGT mRNS expressziójának változása oxidatív stressz hatására

Kísérleteinkben az O-glikozilációt katalizáló OGT-nak valamint a HBP fő szabályozó enzimének a GFAT-nak az mRNS expressziós szintjeit is megvizsgáltuk H₂O₂-vel kiváltott oxidatív stressz utáni, különböző regenerációs periódusban gyűjtött neuroblasztóma sejtmintákban. Eredményeink hasonló dinamikát mutattak mind a GFAT, mind az OGT mRNS expressziós szintjében (**9. ábra**). Oxidatív stressz hatására a GFAT és OGT mRNS expressziós szintje a normál expresszió kb. háromszorosára emelkedett, a 4 órás regenerációs időpontnál tetőzve, majd az expressziós szintek fokozatos csökkenést mutattak, a regeneráció 72. órájában megközelítve a kiindulási szinteket. Ezáltal megállapíthattuk, hogy a két enzim expressziós szintjének változása az O-glikozilációhoz hasonló időbeli dinamikát követett.



9. ábra. A GFAT és OGT mRNS expressziójának időbeli változása oxidatív stressz hatására. A GFAT és OGT mRNS expresszió szintjének relatív növekedését a kontrollhoz normalizálva ábrázoltuk. Az adatok három független kísérlet átlagai \pm S.E.M.; * $p < 0,05$ kontroll sejtekhez képest.

IV.1.2. MEGBESZÉLÉS

Munkám első felében az O-glikoziláció dinamikáját és foszforilációval való kapcsolatát vizsgáltuk akut stressz hatására neuronális sejtvonalon.

Az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalon a 30 percig tartó 0,5 mM H₂O₂ kezelésnek, mint akut oxidatív stressznek, illetve az azt követő regenerációnak hatását vizsgáltuk az O-glikoziláció dinamikájában. Igazoltuk, hogy a fehérjék O-glikozilációs módosulása és az O-glikoziláció folyamatában kulcsfontosságú enzimek, az OGT illetve a GFAT mRNS expressziós szintjei hasonló időbeli dinamikát mutatnak (**8A. és 9. ábra**), ugyanis szignifikánsan emelkedett O-glikozilációs és fokozott mRNS expressziós szinteket találtunk 2-4 órával a stressz utáni állapotban, melyek körülbelül 24-72 óra elteltével a stressz előtti normál szintre tértek vissza. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az O-glikozilációs módosulás a celluláris stresszválasz érzékeny és dinamikus markere.

Számos kísérletben vizsgálták már az O-glikoziláció intracelluláris folyamatokban betöltött szabályozó szerepét, mint a sejtciklusban [123], epigenetikában [124], Ca²⁺ jelátviteli mechanizmusokban [76] vagy foszforilációban [125], ugyanakkor az O-glikoziláció celluláris adaptációban [70] betöltött szerepe is egy elég intenzíven tanulmányozott terület. Az elmúlt években főként állati szívizom- és vázizomsejtekben vizsgálták az O-glikoziláció módosulását hipoxiával illetve oxidatív stresszel szemben [73,97]. Bizonyítottá vált, hogy globális O-glikozilációs szint emelkedés következik be általában röviddel a stressz után, és a megemelkedett O-glikozilációs szint képes kivédeni a stressz káros hatásait [74,94,96,126]. Rágcsálók szívizomszövetein végzett kísérletekkel bizonyították, hogy a megemelkedett O-glikozilációnak egyfajta védő szerepe is lehet, javítva a szívizom kontraktilitását és csökkentve az infarktus mértékét [68]. Számos elmélet, mely az O-glikoziláció védő hatását magyarázza, felveti például a hősokkfehérjék aktiváció vagy a Ca²⁺ jelátvitel módosulás szerepét [97,127], de az O-glikoziláció sokrétű túlélési mechanizmusa továbbra is tisztázásra vár.

A szívizomszövetekkel és vázizomsejtekkel ellentétben, viszonylag kevésbé ismert az O-glikoziláció mintázatának változása az idegsejtekben stressz hatására. A rendelkezésre álló irodalmi adatok ellentmondásosak, míg hipotónia [128] vagy lipopoliszacharid indukálta stressz [129] hatására inkább O-glikoziláció csökkenés következett be, addig a glükóz nélkülözés szignifikánsan növelte az O-glikozilációs szinteket [130]. Kísérleteink során tapasztalt akut stressz hatására bekövetkező O-glikozilációs módosulás a szívizomsejtekben leírtakhoz hasonlóan változott SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonalon is (**8A. ábra**),

amit a HBP útvonalat szabályozó enzimek expressziójának növekedése is kísért, biztosítva így a sejtek fokozott O-glikozilációs szükségletét (**9. ábra**). Eredményeink bizonyítják, hogy az O-glikoziláció oxidatív stressz hatására bekövetkező emelkedése az idegsejtekben is egy aktívan szabályozott folyamat, de ugyanakkor felmerül az O-glikoziláció védő szerepe is.

Jól ismert, hogy az O-glikozilációs módosulás jelentős preventív faktor nem csak az iszkémiareperfúzióban [74], hanem Alzheimer-kórban is [91]. Az Alzheimer betegség kialakulásában szerepet játszik az O-glikoziláció és foszforiláció közötti egyensúlyi állapot megbomlása [55,88], mely során tau fehérjék foszforilációja és O-glikozilációja közötti dinamikus egyensúlya a foszforiláció javára tolódik el, hiperfoszforilált tau fehérjéket eredményezve, melyek aggregálódva neurofibrilláris kötegeket alkotnak. Az oxidatív stressznek szintén jelentős szerepe van az Alzheimer kór patofiziológiájában, bár az oxidatív stressz és tau foszforiláció közötti kapcsolatok elég ellentmondásosak. Kimutatták, hogy az oxidatív szerek egy része képes hiperfoszforilációt okozni, míg mások a tau fehérje de-foszforilációját indukálhatják [131]. Bizonyítottá vált továbbá, hogy a tau hiperfoszforiláció követheti vagy akár meg is előzheti az oxidatív stresszt [132].

A tau fehérjék O-glikozilációs módosulását oxidatív stresszben korábban még nem vizsgálták. Így kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a foszforiláció és O-glikoziláció közötti kapcsolat rövid ideig tartó oxidatív stressz hatására miként változik. Eredményeink azt mutatták, hogy a 30 perces 0,5 mM H₂O₂-os kezelés következtében a tau foszforilációja a [Ps¹⁹⁹] és PHF1 helyeken az O-glikozilációval ellentétesen viselkedett, csökkenést mutatva (**8B. ábra**), ugyanakkor a [Ps²⁶²] hely foszforilációs mintázata megegyezett az O-glikoziláció mintázatával. Az O-glikozilációnak és foszforilációnak az ellentétes viselkedésére magyarázatként szolgálhat, hogy képesek ugyanazon Ser/Thr helyekért versengeni, de akár egymáshoz közeli módosítási helyeket is képesek befolyásolni ("proximal site effect") [63]. Az oxidatív stressz utáni fokozott foszforiláció a [Ps²⁶²] helyen (akár más helyeken is) az emelkedett O-glikozilációs szintek ellenére felveti, hogy az O-glikoziláció akár más körülmények között is hozzájárulhat a foszforiláció növekedéséhez.

Habár a H₂O₂ által kiváltott oxidatív stressznek kitett SH-SY5Y neuroblasztómával végzett kísérletekből összegyűjtött O-glikozilációs adatok összhangban vannak a szívizomsejtekben talált adatokkal és bizonyítják az O-glikoziláció és tau foszforiláció közötti kölcsönös kapcsolatot, kérdés, hogy ezeknek a hatásoknak milyen szerepük van akut és krónikus körülményekben. Alzheimer kórban ugyanis az oxidatív stressz ellenére az O-glikoziláció dinamikája, úgy tűnik, megfordul.

Bizonyított, hogy az O-glikoziláció és a sejt szénhidrát anyagcseréje szorosan összefügg, azonban a cukorbetegség és az Alzheimer kór közötti molekuláris mechanizmusok illetve az O-glikoziláció szerepe ezekben a folyamatokban továbbra is kérdéses. Ismert, hogy az Alzheimer kór kialakulásában a cukorbetegség és inzulinrezisztencia is rizikófaktorként szerepelhet [133], növelve a ROS képződését. Az O-glikoziláció szerepének tisztázása ezekben a folyamatokban, illetve hogy ezek a folyamatok hogyan kapcsolódnak a tau foszforiláció szabályozásához, további kutatások tárgyát képezi. Mindazonáltal, arra a következtetésre jutottunk, hogy az O-glikozilációs módosulás a tau foszforiláció párhuzamos tanulmányozása oxidatív stressznek kitett idegsejteken, hozzájárulhat az Alzheimer kór patofiziológiájának pontosabb megértéséhez.

Dolgozatomban ebben a részében sikerült bizonyítani, hogy 30 percig tartó 0,5 mM H₂O₂-os kezelés indukálta oxidatív stressz egy gyors és ideiglenes O-glikozilációs emelkedést okoz SH-SY5Y neuroblasztóma sejtekben. Kimutattuk, hogy a fehérjék O-glikozilációs módosulásának dinamikus változásával ellentétes módon viselkedik a tau foszforiláció a [Ps¹⁹⁹] illetve PHF-1 helyeken az oxidatív stresszt követő regenerációs periódusokban. Összegezve, úgy véljük az O-glikozilációs szabályozás egy fontos mechanizmus a stressz adaptációban és feltételezhető, hogy a fehérjék O-glikozilációs módosulása része egy olyan komplex rendszernek, amely nem csak az akut hatásokat, hanem a krónikus patofiziológiájú eseményeket is befolyásolhatja.

IV.2. O-GLIKOZILÁCIÓ MÓDOSULÁSA HUMÁN FEHÉRVÉRSEJTEKBEN AKUT TESTEDZÉST KÖVETŐEN

IV.2.1. EREDMÉNYEK

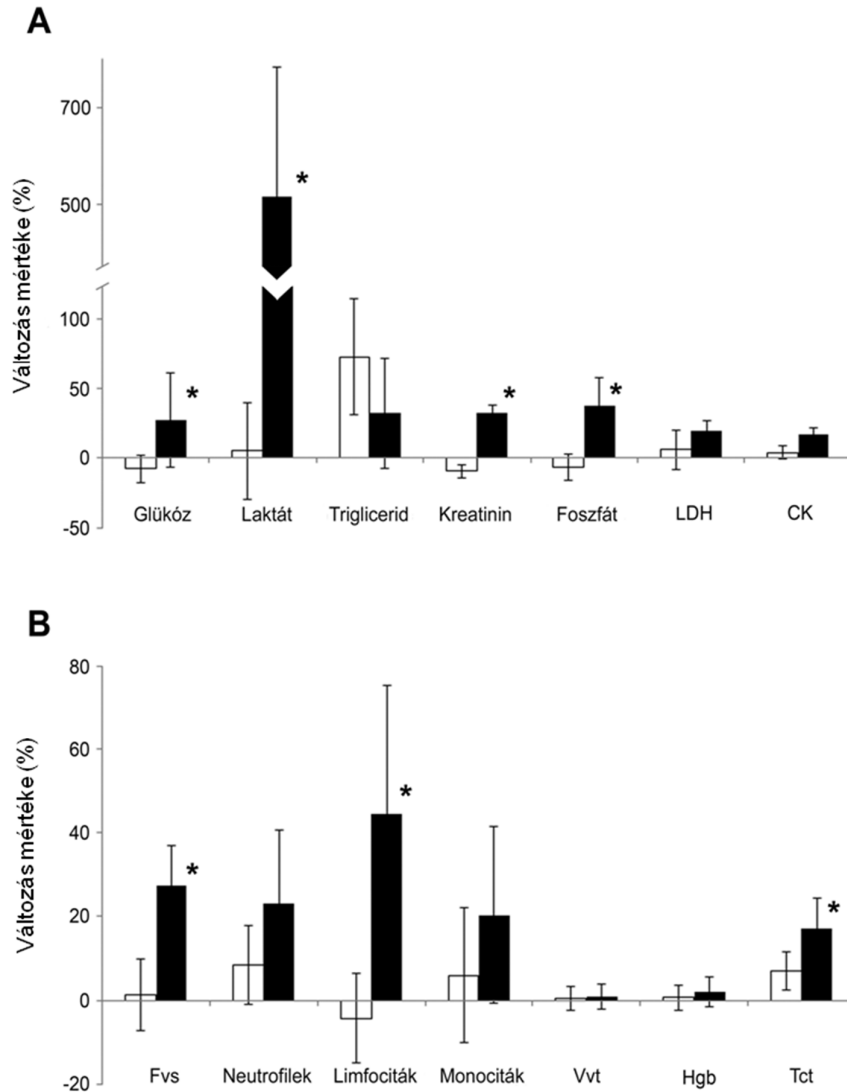
IV.2.1.1. Testedzés hatása a humán vérmintákból mért klinikai paraméterekre

Önkéntesek vérmintáiból számos biokémiai paramétert analizáltunk, ionokat, anyagcsere paramétereket, intracelluláris és gyulladáshoz köthető markereket, valamint sejtes elemeket, amelyeket az **5. táblázat** foglal össze. A kora reggeli, éhgyomri vérvételi mintákból mért összes paramétert normál tartományon belül találtuk. A nyugalmi periódus, és a testedzés előtti mintákból mért paraméterek összehasonlítva szignifikáns különbséget nem találtunk. A nyugalmi periódus két vérvételéből mért egyes paraméterek (inzulin, triglicerid, albumin és kreatinin) tekintetében, fizikai aktivitás hiányában is jelentős változásokat találtunk. Ezek a változások, bár statisztikailag szignifikánsak voltak, betudhatók a napi ingadozásnak (albumin, kreatinin) illetve a standardizált reggeli metabolikus, posztprandiális hatásának. Akut testedzést követően a két vérvételből mért értékek között számos szignifikánsan emelkedett paramétert találtunk: emelkedett a foszfát, laktát, kreatinin, laktát-dehidrogenáz (LDH), albumin szint illetve fehérvérsejtszám, limfocita és trombocitaszám. A napi ingadozások illetve a posztprandiális hatások kizárása érdekében a napközbeni változásokat összehasonlítottuk a nyugalmi periódusban és a testedzési részben tapasztalt napközbeni változásokkal. Megállapítottuk, hogy a nyugalmi periódushoz viszonyítva testedzés következtében szignifikáns változások következtek be a *glükóz* (átlagos napi változás: 27,2% vs.-7,9%), *laktát* (51,5% vs 5%), *kreatinin* (32% vs -9,6) *foszfát* (37,5% vs. -6,3%) szintekben, illetve a *fehérvérsejtszám* (27,6% vs 1,3%), a *limfocita* (44,5% vs. -4,4%) és a *trombocita* (17,3% vs 7,1%) értékekben.

	Nyugalmi periódus		Testedzés		Mérték- egység
	Előtte	Utána	Előtte	Utána	
Nátrium	140,7 ± 1,1	140,2 ± 1,1	141,4 ± 1,2	142,0 ± 1,3	mM/l
Kálium	4,3 ± 0,3	4,6 ± 0,2	4,3 ± 0,2	4,2 ± 0,2	mM/l
Klorid	97,8 ± 1,6	98,2 ± 1,3	101,6 ± 2,8	99,8 ± 2,7	mM/l
Foszfát	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,3 * # ‡	mM/l
Inzulin	40,0 ± 8,0	59,5 ± 9,3 *	54,0 ± 29,6	51,9 ± 38,9	mU/l
Laktát	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,4	6,9 ± 1,7 * # ‡	mM/l
Glükóz	5,2 ± 0,3	4,8 ± 0,7	5,1 ± 0,4	6,4 ± 1,6	mM/l
Bilirubin	13,7 ± 6,7	13,5 ± 7,2	14,8 ± 7,8	13,7 ± 7,8	μM/l
Karbamid	5,6 ± 1,6	5,2 ± 1,4	5,4 ± 1,3	5,2 ± 1,1	mM/l
Kreatinin	86,5 ± 9,6	78,2 ± 9,3 *	77,5 ± 6,3	102,2 ± 7,0 * # ‡	μM/l
Húgysav	319,7 ± 53,5	302,7 ± 59,6	314,2 ± 40,8	355,0 ± 47,4	μM/l
Koleszterin	4,7 ± 0,7	4,9 ± 0,7	4,7 ± 0,7	4,8 ± 0,7	mM/l
Triglicerid	1,2 ± 0,4	1,9 ± 0,4 *	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,5	mM/l
LDH	318,0 ± 32,9	336,5 ± 56,9	318,5 ± 26,2	380,5 ± 33,2 * ‡	U/l
Alkalikus foszfatáz	63,2 ± 10,6	67,0 ± 11,7	74,1 ± 15,4	77,0 ± 13,0	U/l
Kreatin-kináz	179,3 ± 81,0	183,8 ± 75,1	196,5 ± 82,3	229,8 ± 90,6	U/l
Összfehérje	74,0 ± 2,2	76,3 ± 2,6	75,7 ± 4,0	78,0 ± 2,7	g/l
Albumin	48,8 ± 2,0	51,0 ± 1,9 *	49,4 ± 2,9	51,9 ± 2,3 * ‡	g/l
C reaktív protein	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3	mg/l
Fehérvérsejtszám	6,3 ± 0,8	6,4 ± 1,1	6,6 ± 1,0	8,4 ± 1,4 * # ‡	G/l
Neutrofil	3,0 ± 0,7	3,3 ± 1,0	3,2 ± 0,8	3,9 ± 0,9	G/l
Limfocita	2,3 ± 0,3	2,2 ± 0,3	2,5 ± 0,3	3,6 ± 0,7 * #	G/l
Monocita	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	G/l
Eozinofil	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,3	G/l
Bazofil	<0,1 ± 0,0	<0,1 ± 0,0	<0,1 ± 0,0	<0,1 ± 0,0	G/l
Vörösvértest	5,4 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,2 ± 0,3	5,3 ± 0,3	T/l
Hemoglobin	154,3 ± 7,4	155,5 ± 10,7	152,0 ± 9,4	155,9 ± 9,2	g/l
Hematokrit	47,1 ± 2,0	46,9 ± 2,7	46,9 ± 2,6	46,3 ± 2,2	%
Trombocita	220,8 ± 17,5	236,8 ± 24,1	233,2 ± 19,3	273,7 ± 30,5 * # ‡	G/l

5. táblázat. Biokémiai és vérkép paraméterek önkéntesek nyugalmi periódus és testedzés előtti és utáni vérvételeiből. Az adatok átlagai ± SD (n=6), *p<0,05 nyugalmi periódus előttihez képest, #p<0,05 nyugalmi periódus utánihoz képest, ‡p<0,05 testedzés előttihez képest.

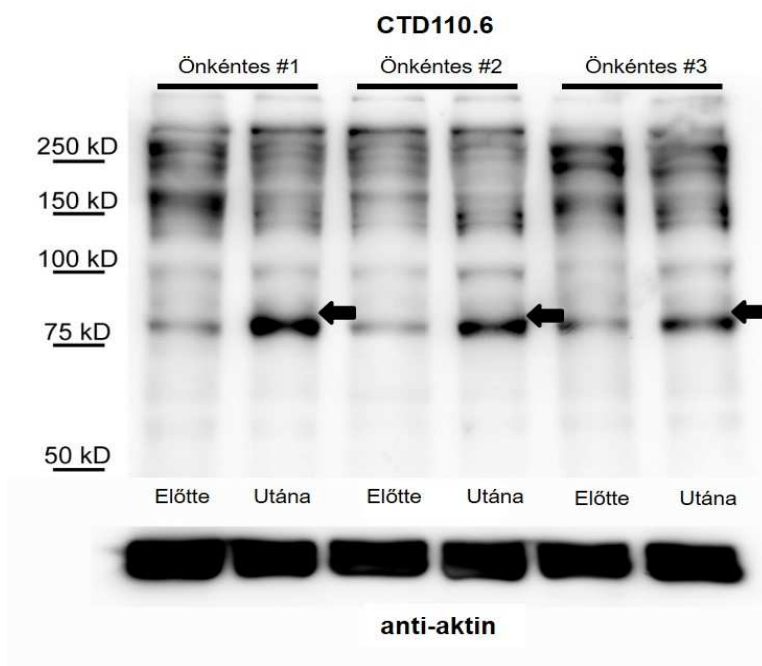
Kétutas ismétlődő ANOVA-t használtunk a változások értékeléséhez, a párhuzamos összehasonlításokat Bonferroni korrekciójával végeztük.



10. ábra. Önkéntesek vérmintáinak és vérsejt paramétereinek átlagos változása nyugalmi periódusban, testmozgás előtt illetve testmozgást követően. **A. ábra:** A metabolizmusra és a prekondicionálás mértékére vonatkoztatott szérumbiokémiai paraméterek átlagos napi ingadozásai nyugalomban (nyitott oszlopok) illetve a testedzést követően (fekete oszlopok). **B. ábra:** A vérkép paraméterek napközbeni ingadozásainak átlagai nyugalmi periódusban vett mintákban (nyitott oszlopok) vagy a testmozgás után (fekete oszlopok). A nyugalmi periódus vagy a testedzés utáni relatív változásokat a megfelelő „előtte” értékek százalékában fejeztük ki. Az adatok átlag \pm SD, * $p < 0,05$ a nyugalmi periódushoz képest.

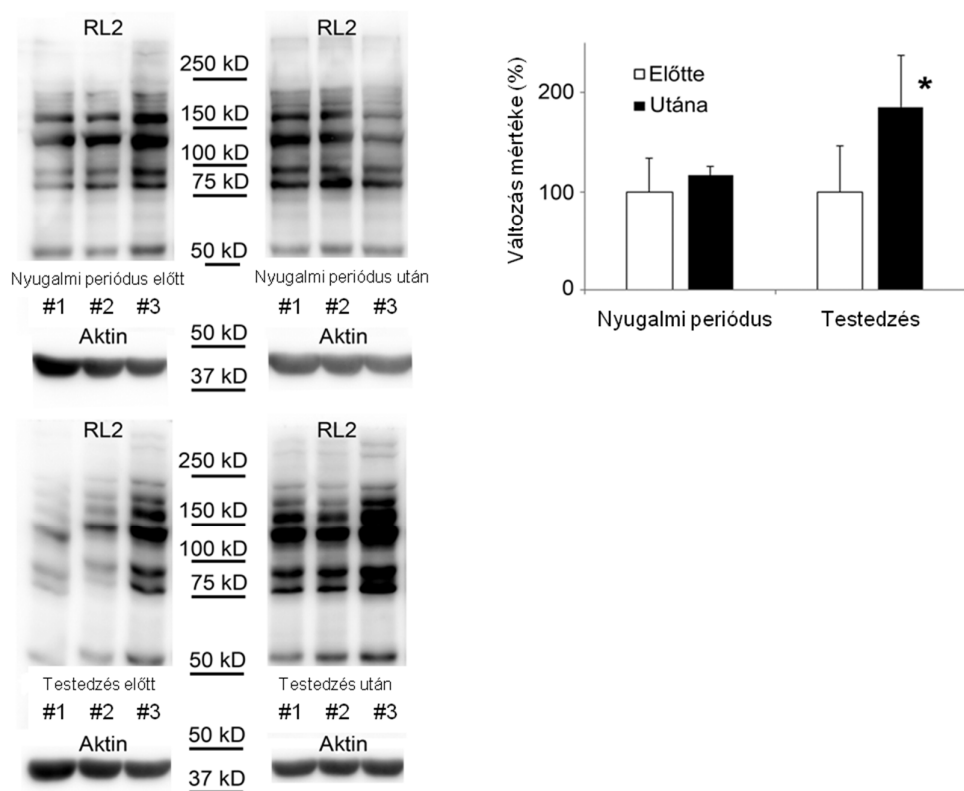
IV.2.1.2. Izolált mononukleáris sejtek O-glikozilációs mintázata testedzés után

Az előkísérlet valamint a standardizált körülmények önkénteseinek K-EDTA-val antikoagulált vérmintáiból Histopaque-1077 oldattal mononukleáris sejteket izoláltunk. Western blot módszerrel a mintákból az O-glikozilált fehérjék mennyiségét és mintázatát vizsgáltuk CTD110.6 és RL2 anti-O-glikozilációs antitestek segítségével aktinra normalizálva. Az előkísérlet önkénteseinél 75 kD magasságban lévő fehérjék esetében O-glikoziláció emelkedés figyelhető meg a testedzés utáni mintákban (**11. ábra**).



11. ábra. Előkísérletben résztvevő önkéntesek testedzés előtti és utáni izolált fehérvérsejtjeinek CTD110.6 antitesttel jelölt O-glikozilációs mintázata. 75 kD magasságában emelkedett fehérje O-glikozilációs változás látható (nyilak).

A standardizált körülmények között végzett testedzés résztvevőinél várakozásoknak megfelelően nem találtunk szignifikáns eltérést a nyugalmi periódusokban. Amint az a **12. ábrán** is látható a 2 mérföldes futást követően ($85 \pm 51\%$ -os emelkedést mutatott, $p < 0,05$) szignifikáns O-glikozilációs növekedést találtunk az edzés előtt gyűjtött mintákhoz képest ($16 \pm 9\%$ -os növekedés).

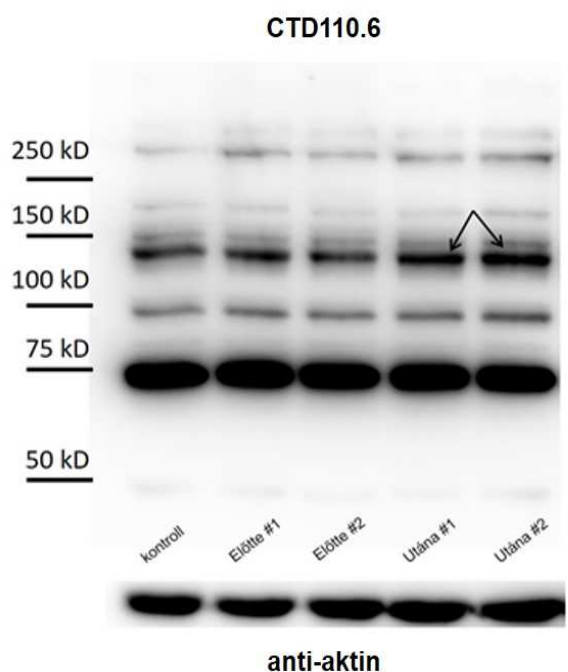


12. ábra. Standardizált körülmények önkénteseinek izolált leukocitáiban vizsgált O-glikoziláció emelkedés testedzés hatására. **Bal oldalon:** Western blot analízis RL2 anti-O-glikozilációs és anti-aktin jelöléseket követően nyugalmi periódusban illetve testedzésnek kitétt izolált fehérvérsejtek fehérjekivonataiból. **Jobb oldalon:** RL2-festés denzitometriás analízise. Minden adatponton hat különböző egyén mintájának átlaga látható. A nyitott oszlopok az „előtte” minták átlag \pm SD értékét, míg a fekete oszlopok az „utána” minták átlag \pm SD értékét jelzik. * $p < 0,05$ a testmozgás előttihez képest.

IV.2.1.3. O-glikoziláció vizsgálata Jurkat sejtekben különböző kezeléseket követően

Jurkat sejteket az előkísérletben résztvevő önkéntesek testedzés előtti és utáni összegyűjtött humán szérumával, különböző koncentrációjú tejsavval és epinefrinnel inkubáltuk 1 órán át illetve IL-6-al 1 és 6 órán keresztül. A kezelt sejtekben feltárás után western blot módszerrel a fehérjék O-glikoziláltságát CTD110.6 antitesttel vizsgáltuk. Belső kontrollként poliklonális anti-aktin antitestet használtunk. Bár szignifikáns eltérést egyik esetben sem találtunk, diszkrét

O-glikoziláció emelkedés volt megfigyelhető a humán testedzés utáni szérumok alkalmazása esetén (**13. ábra**).

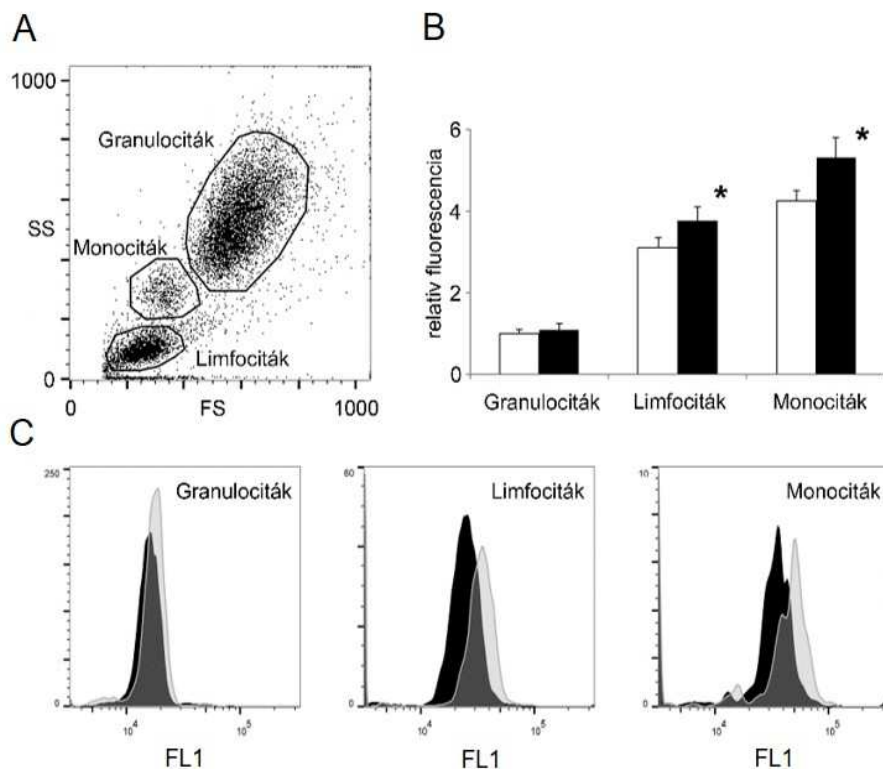


13. ábra. *Testedzés előtti és utáni humán szérummal kezelt Jurkat sejtek O-glikozilációs változásának detektálása CTD110.6 antitesttel. Diszkrét O-glikozilációs emelkedés látható a testedzés utáni humán szérummal kezelt mintákban (nyilak).*

IV.2.1.4. O-glikoziláció módosulásának vizsgálata fehérvérsejt alpopulációkban áramlási citométerrel

Fehérvérsejt alpopulációk O-glikoziláltságának megállapítása céljából standardizált körülmények önkénteseinek testedzés előtti illetve utáni izolált és fixált fehérvérsejtjeit fluoreszcens RL2 anti-O-glikozilációs antitesttel jelöltük és áramlási citométerrel vizsgáltuk. Negatív kontrollként ugyanezen mintákat az elsődleges antitest kihagyásával is megjelöltük. Amint az **14A. ábrán** is látható a FSc illetve SSc fényszórás segítségével a sejteket méretük és szemcsézettségük alapján három különböző csoportba sorolhatjuk, *granulocitákat*, *limfocitákat* és *monocitákat* különítve el. Így a 3 sejtpopulációban az O-glikozilációs szinteket külön-külön is tudtuk elemezni a FL1 fluoreszcens csatorna segítségével (**14B. ábra**). A granulocita sejtcsoportokon hasonló O-glikozilációs szinteket mértünk testedzés előtt illetve után (relatív

fluoreszcencia: $1,0 \pm 0,1$ vs $1,1 \pm 0,16$), míg a limfociták (relatív fluoreszcencia: $3,1 \pm 0,26$ vs $3,8 \pm 0,34$, $p < 0,05$) és monociták (relatív fluoreszcencia: $4,2 \pm 0,25$ vs $5,3 \pm 0,48$, $p < 0,05$) esetében szignifikáns jobbra tolódást detektáltunk testezés után. Munkánkban talált egyértelmű limfocitaszám emelkedés a testezés után ($2,3 \pm 0,5$ G/l vs $3,2 \pm 0,8$ G/l, $p < 0,05$) több O-glikozilálódott sejtet tartalmazó limfocita csoport jelenlétére utalt a vérkeringésben. Ezt a feltevést igazolta a FL1 csatornával kapott hisztogramon a limfociták Gauss görbe szerinti eloszlása is mind testezés előtt, mind pedig testezés után (**14C ábra**).



14. ábra. Áramlási citométerrel detektált O-glikoziláció változás a fehérvérsejt alpopulációkban testezés után. **A. ábra.** A FS_c (x tengely) valamint a SS_c (y tengely) függvény alapján granulociták, limfociták és monociták besorolása. **B. ábra.** Az O-glikozilált sejtek relatív FL1 fluoreszcencia szintjei. A nyitott oszlop a testmozgás előtti, míg a fekete oszlop a testmozgás utáni állapotot mutatja. A kiindulási értékhez az edzés előtt összegyűjtött granulociták átlagos fluoreszcencia szintjét választottuk ki negatív kontrollok háttérként való kivonása után. Az adatok az átlaga \pm SD, * $p < 0,05$ testezés előttihez képest. **C. ábra.** A fehérvérsejtek 3 alpopulációjának O-glikozilációs festésének ábrázolása egyenként külön-külön hisztogramon. A testezés előtti sejtek eloszlását sötét hisztogramok, a testezés utáni eloszlást világos hisztogramok ábrázolják.

IV.2.2. MEGBESZÉLÉS

Dolgozatom második felében vizsgálatunk célja volt egyszeri fizikai aktivitás akut hatásainak tanulmányozása az O-glikoziláció és izolált humán leukociták kapcsolatában. A fizikai aktivitás egy 2 mérföldes futó gyakorlatot jelentett, olyan időtartam alatt, mely során a testedzés nem haladta meg a résztvevők adaptációs kapacitását. A hormonális variabilitás zavaró hatásainak csökkentése érdekében a kísérletbe kizárólag férfi önkénteseket válogattunk be. A nyugalmi periódusban valamint testedzés előtt és után gyűjtött vérmintákból a prekondicionálás mértékét igazoló markereket, ionokat, metabolikus és gyulladáshoz kapcsolódó markereket mértünk. Az O-glikozilációs szintek változásának detektálásához fehérvérsejteket izoláltunk.

Prekondicionálásra érzékeny biokémiai markerek (kreatin-kináz, LDH) szintje testedzés után nem mutatott szignifikáns emelkedést. Az IL-6 szintek is - amelyekről ismert, hogy a testmozgással arányosan emelkednek- referencia tartományon belül maradtak. Az edzés utáni laktátszintek alapján feltételezhető volt, hogy a fizikai terhelés megközelítőleg megfelelt azon állapotnak, ahol az aerob-anaerob átalakulás történik (~4 mM laktát) [134].

Izolált fehérvérsejtekből az O-glikozilációs változásokat detektáltuk testmozgás előtt és után összehasonlítva a nyugalmi periódussal. Vizsgálataink során jelentős O-glikoziláció emelkedést észleltünk a testmozgás utáni mintákban a testedzés előttihez képest. Áramlási citometria segítségével igazoltuk, hogy az elkülönített fehérvérsejt alpopulációkban az O-glikozilációs szintek növekedéséért elsősorban a limfociták, kisebb mértékben a monociták voltak felelősek, míg a neutrofil granulociták O-glikozilációs szintje viszonylag változatlan maradt.

Mint tudjuk, az O-glikoziláció egy védő intracelluláris mechanizmus több különböző típusú stresszorral szemben, mint a hipoxia, oxidatív stressz, hő sokk és ozmotikus kihívások [70], illetve prekondicionálási folyamatokban is részt vesz. A stressz indukálta O-glikoziláció számos következménnyel járhat, befolyásolhatja a transzkripciót, növelve a HSP-k expresszióját, foszforilációs jelátvitelt vagy a fehérjék lebomlását [63,135], ugyanakkor képes a stressz okozta intracelluláris szabad kalcium szint emelkedésének káros hatásait is kivédeni [136]. Számos kutatócsoporthoz hasonlóan [103,110,136], akut oxidatív stressz hatását vizsgálva korábbi kutatásainkban mi is azt találtuk, hogy az O-glikoziláció képes percek alatt megemelkedni [137], javítva a sejtek túlélését. Azonban a legtöbb ilyen irányú kutatást főként állati szívizomon végezték. A humán vérmintából izolált immunsejtek, az O-glikoziláció és a fizikai aktivitás együttes kapcsolatát ez idáig nem vizsgálták. Bár korábban már végeztek

kísérleteket egészséges férfiak teljes vérmintáiból az O-glikoziláció és az aerob kapacitás ($VO_{2csúcs}$) közötti kapcsolat tanulmányozása végett, azonban ezeket a mintákat csak nyugalomban lévő egyénektől gyűjtve, nem találtak szignifikáns összefüggést [138].

Irodalmi adatokból ismert, hogy az immunrendszer nem csak fizikai aktivitás által befolyásolható, hanem része a szisztémás adaptációnak és egyben válaszreakció is a fizikai kihívásokra [139]. Edzés során körülhatárolt gyulladási válasz alakulhat ki az izmok mikrokárosodása, csökkent véráramlás következtében a bakteriális transzlokáció vagy a közvetlen oxidatív stressz hatása révén [140,141]. Ugyanakkor az aktivált leukociták és a fellépő gyulladási válasz elősegítheti a gyógyulást és regenerációt [141,142].

A fizikai aktivitás egyik korai következménye a fehérvérsejtek demarginációja és a leukocitózis [143,144]. Ennek fényében az önkéntesek vérmintáiban tapasztalt fizikai aktivitás utáni keringő leukociták számának szignifikáns növekedése várható eredmény volt és jól korrelált a korábbi kutatásokban leírtakkal [144,145]. Eredményeinkből jól látszik, hogy a testedzés kihat az immunrendszer működésére, azonban a folyamat háttérben zajló molekuláris mechanizmusok nem teljesen tisztázottak. Számos tényező befolyásolhatja a testedzés immunmoduláló hatását, mint a testedzés hossza, intenzitása, aerob vagy anaerob jellege és a korábbi edzettségi állapot [146,147]. Bizonyított, hogy a megerőltető gyakorlatok végzése, amit a test ugyan még nehezen, de képes tolerálni, immunuszuppresszióhoz vezethet, míg a mérsékelt testedzés előnyös az immunrendszer számára és csökkentheti a fertőzések előfordulását [139,148]. A különbség a testedzés pro- és anti-inflammatorikus hatásai között nem egyértelmű, egyfajta dinamikus egyensúlyként fogható fel, amely számos jelátviteli folyamat következménye [146].

Tudva, hogy az O-glikozilációs módosulás a stresszválasz rendszer része, kísérleteinkben főként arra kerestük a választ, hogy az O-glikoziláció hogyan befolyásolja az immunválaszt a testedzés során. Igazolt, hogy az O-glikoziláció gyulladási válaszokban is részt vehet [149–153], de pontos szerepe és funkciója a gyulladási folyamatok szabályozásában még nem tisztázott [127,154]. Az O-glikoziláció az immunsejtek aktiválásának számos jelátviteli elemét modulálhatja; például a NF- κ B nukleáris transzlokációját, amely kulcsfontosságú transzkripció szabályozó faktor az immunválaszokban. O-glikozilációs módosulási helyeket tartalmazva, az O-glikoziláció képes ezáltal aktiválni [150,155,156], de ugyanakkor gátolni is [151,152,157]. Ennek az ellentmondásos eredménynek oka feltehetőleg a NF- κ B O-glikozilációs és foszforilációs helyei közötti komplex kölcsönhatás. A sejttípustól, a stressz időtartamától, jellegétől és intenzitásától függően különböző poszt-transzlokációs mintázatok

alakulhatnak ki a NF- κ B-ben, és ennek következtében különböző eredményeket is produkálhatnak.

Annak ellenére, hogy az O-glikozilációs módosulásnak a szerepe az immunsejtekben még nem teljesen tisztázott, az eddigi adatok azt mutatják, hogy az O-glikoziláció emelkedése fehérvérsejtekben egy gyors és mérhető válaszfolyamat [111,158]. Munkánkban sikerült igazolni, hogy a fehérvérsejtek O-glikozilációs szintje akut stressz, azaz testedzés hatására emelkedik. Kísérleteink során használt módszerekről (western blot, áramlási citometria) korábbi tanulmányokban már igazolták, hogy alkalmasak a fehérvérsejtek O-glikozilációs szintjeinek mérésére és értékelésére [159–161]. Míg western blot technikával csupán a fehérvérsejtek általános O-glikoziláltsági mintázatát detektáltuk, addig az áramlási citometria lehetővé tette a leukocita alpopulációk elkülönítését és O-glikoziláltsági állapotuk külön-külön meghatározását. Ez utóbbi módszer hátránya, hogy a granulocita, monocita és neutrofil populációk elkülönítés FSc és SSc szóródás alapján történik. Eredményeinket a jövőben O-glikozilációs fehérjék és olyan specifikus leukocita sejtfelszíni markerek egyidejű jelölésével szeretnénk megerősíteni, mint CD45, CD3, CD19, CD4, CD8, esetleg CD56.

Mivel az O-glikoziláció, nem csak a celluláris stresszválaszban játszik szerepet, hanem UDP-GlcNAc szubsztrát révén direkt kapcsolatban áll a metabolizmussal is, ezért a metabolizmust érintő változások (akár stressz, akár prekoncionálás) közvetítésében logikus választásnak tűnik. További kérdésként felmerült, hogy a testmozgás során bekövetkező változások (hipoxia, emelkedett glükóz szint, acidózis, miokinek, IL-6) közül, melyek okozhatják az O-glikoziláció emelkedést. Az O-glikoziláció emelkedés közvetlen aktivátora kísérleti beállításainkból sem derült ki. Előzetesen külön vizsgálva Jurkat sejtekben az egyes komponensek (tejsav, epinefrin, IL-6) O-glikozilációra kifejtett hatását, szignifikáns eltéréseket egyiknél sem észleltünk. Ezek alapján arra a következtésre jutottunk, hogy több fizikai és biokémiai tényező együttes hatása szükséges az O-glikoziláció jelentős emelkedéséhez. Agonisták, mint az epinefrin és az angiotenzin II [136] és/vagy az oxidatív stressz [137] nagy valószínűséggel felelősek a tanulmányunkban megfigyelt O-glikoziláció emelkedéséért, de eddig nem áll rendelkezésre olyan leukocitákon vagy leukocita eredetű sejteken végzett kísérleti bizonyíték, mely ezt megerősíthetné.

Bizonyított, hogy mérsékelt intenzitású edzés alatt, a vér glükóz szintje viszonylag stabil maradhat, míg az izmok glükóz felvétele a testmozgás során megnövekedhet, ezt a folyamatot a máj fokozott glükóz termelése egyenlíti ki [162]. A vércukorszint ingadozása elfogadható magyarázat lehetne az O-glikozilációs szintekben mért változásokra. Ismert ugyanis, hogy a

hipoglikémia paradox módon növelheti az O-glikozilációt [163], azonban kísérletünkben a futást követően mért plazma glükóz értékek - a nagy egyéni változások ellenére is - csak kissé növekedtek. A legtöbb tanulmány azonban a hiperglikémia hatását sokkal magasabb glükóz koncentrációnál (25-30 mM) vizsgálta. Kutatási eredmények igazolják továbbá, hogy mérsékelt emelkedett glükóz szint (~1 mM emelkedés) az O-glikoziláció szintjét csak hosszú távú körülmények (pre-diabétesz) között növelte [159,164].

Összefoglalva, munkánkban sikerült kimutatni, hogy egyszeri testmozgást követően emelkedik a fehérvérjék O-glikozilációs szintje fehérvérsejtekben is. Azt is igazoltuk, hogy a változás nagy része a limfocitákat érinti, míg a granulociták viszonylag változatlanok maradtak. Bár a leukocitákban az O-glikoziláció komplex folyamatának megértése további vizsgálatokat igényel, eredményeink segíthetnek az O-glikoziláció stressz adaptációs mechanizmusokban betöltött szerepének tisztázásában. A mechanizmus ismeretétől függetlenül az O-glikoziláció mérése humán mintákban hasznos kiegészítője lehet a laboratóriumi diagnosztikának; például alkalmas lehet sportolók fizikai állapotfelmérésére vagy metabolikus szindrómás betegek szűrésére.

V. ÚJ EREDMÉNYEK TÉTELES ÖSSZEFOGLALÁSA

Kutatómunkám során az O-glikoziláció és akut stressz kapcsolatát vizsgáltuk sejt kultúrákban illetve izolált humán leukocitákban.

Humán neuroblasztóma sejt vonalon 30 percig ható hidrogén-peroxidos kezelést követően a következőket találtuk:

- A fehérjék O-glikozilációs szintje a kezelést követő 2-4 órában szignifikánsan emelkedett a kontrollhoz képest, majd a regenerációs periódus végén közel a kiindulási szintre tért vissza.
- Az O-glikoziláció és foszforiláció közötti kölcsönhatást tau ellenes antitestekkel vizsgáltuk. A foszfospecifikus [Ps¹⁹⁹] és PHF-1 tau fehérjék foszforilációs szintje az O-glikozilációval ellentétes irányú dinamikát mutatott, míg [Ps²⁶²] tau fehérjék szintje az O-glikozilációval párhuzamosan emelkedett, majd 24-72 óra elteltével az kiindulási szintre csökkent.
- Az O-glikoziláció szabályozásában résztvevő enzimek közül a GFAT és OGT mRNS expressziós szintjét vizsgálva az O-glikozilációhoz hasonló emelkedést találtunk stressz utáni regenerációs periódus 2-4 órájában.

Rövid ideig tartó fizikai aktivitás és O-glikoziláció közötti kapcsolatot tanulmányozva humán vérmintákon az alábbi eredményekre jutottunk:

- Testedzést követően mért biokémiai paraméterek közül szignifikáns változásokat találtunk a nyugalmi periódushoz viszonyítva a glükóz, laktát, foszfát, kreatinin szintekben.
- Izolált humán fehérvérsejtekben szignifikánsan emelkedett O-glikozilációs szinteket detektáltunk a testedzést követően.
- Fehérvérsejtek három alpopulációjának O-glikoziláltsági állapotát külön-külön vizsgálva szignifikánsan emelkedett O-glikozilációt találtunk a monocitákban és limfocitákban testedzést követően.

IRODALOMJEGYZÉK

- 1 Selye H. Stress without Distress. *Psychopathology of Human Adaptation*. 1976. p. 137–46.
- 2 Selye H. Citation classics: The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol* 1946; **6**: 117–231.
- 3 Kültz D. Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response. *Annu Rev Physiol* 2005; **67**: 225–57.
- 4 de Nadal EE, Ammerer G, Posas F. Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet* Nature Publishing Group; 2011; **12**: 833–45.
- 5 Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010; **2010**: 214074.
- 6 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001. p. 37–40.
- 7 Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK , JNK , and p38 Protein Kinases The Protein Kinase Complement of the Human Genome. 2002; **298**: 1911–3.
- 8 Chen BPC, Li M, Asaithamby A. New insights into the roles of ATM and DNA-PKcs in the cellular response to oxidative stress. *Cancer Lett* Elsevier Ireland Ltd; 2012; **327**: 103–10.
- 9 James LR, Tang D, Ingram A, Ly H, Thai K, Cai L, Seholey JW. Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor κ B-dependent promoter activation. *Diabetes* 2002; **51**: 1146–56.
- 10 Milisav I. Cellular Stress Responses. *Adv Regen Med* 2011; 215–32.
- 11 Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011. p. 324–32.
- 12 Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the Mammalian Unfolded Protein Response. *Biotechnol Bioeng* 2012; **108**: 2777–93.
- 13 Muralidharan S, Mandrekar P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukoc Biol* 2013; **94**: 1167–84.
- 14 Kültz D, Kültz D. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J Exp Biol* 2003; **206**: 3119–24.
- 15 Wu Y-T, Wu S-B, Wei Y-H. Metabolic reprogramming of human cells in response to

- oxidative stress: implications in the pathophysiology and therapy of mitochondrial diseases. *Curr Pharm Des* 2014; **20**: 5510–26.
- 16 Walter P, Ron D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science (80-)* 2011; **334**: 1081–6.
- 17 Knowlton A a. Life, death, the unfolded protein response and apoptosis. *Cardiovascular Research*. 2007; **73**: 1–2.
- 18 Chen X, Liu X, Wan X, Wu Y, Chen Y, Cao C. Ischemic preconditioning attenuates renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting activation of IKKbeta and inflammatory response. *Am J Nephrol* 2009; **30**: 287–94.
- 19 Iliodromitis EK, Lazou A, Kremastinos DT. Ischemic preconditioning: Protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag* 2007; **3**: 629–37.
- 20 Alreja G, Bugano D, Lotfi A. Effect of remote ischemic preconditioning on myocardial and renal injury: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Invasive Cardiol* 2012; **24**: 42–8.
- 21 Papadakis M, Hadley G, Xilouri M, Hoyte LC, Nagel S, Mcmenamin MM, Tsaknakis G, Watt SM, Drakesmith CW, Chen R, Wood MJA, Zhao Z, Kessler B, Vekrellis K, Buchan AM. Tsc1 (hamartin) confers neuroprotection against ischemia by inducing autophagy. *Nat Med* 2013; **19**: 351–7.
- 22 Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, Kinoshita M. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: Effects of “remote preconditioning.” *J Am Coll Cardiol Elsevier Masson SAS*; 1999; **33**: 556–64.
- 23 Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCε-isoform. *Cardiovasc Res* 2002; **55**: 583–9.
- 24 Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ. Cardioprotection at a distance: Mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2002; **34**: 1317–23.
- 25 Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M, Jabehdar-Maralani P, Sadeghipour H, Ebrahimi F, Dehpour AR. Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2receptors in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 2008; **579**: 246–52.
- 26 Ding YF, Zhang MM, He RR. Role of renal nerve in cardioprotection provided by renal ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. *Sheng Li Xue Bao* 2001; **53**: 7–

- 12.
- 27 Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **278**: H1571–6.
- 28 Tang ZL, Dai W, Li YJ, Deng HW. Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; **359**: 243–7.
- 29 Konstantinov IE, Arab S, Li J, Coles JG, Boscarino C, Mori A, Cukerman E, Dawood F, Cheung MMH, Shimizu M, Liu PP, Redington AN. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; **130**: 1326–32.
- 30 Peralta C, Fernández L, Panés J, Prats N, Sans M, Piqué JM, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 2001; **33**: 100–13.
- 31 Menting TP, Wever KE, Hendriks EJ, Van der Vliet DJA, Rovers MM, Warle MC. Ischaemic preconditioning for the reduction of renal ischaemia reperfusion injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; **3**: CD010777.
- 32 Lawler JM, Rodriguez DA, Hord JM. Mitochondria in the middle: exercise preconditioning protection of striated muscle. *J Physiol* 2016; **594**: 5161–83.
- 33 Radák Z, Sasvári M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamoto H, Goto S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys* 2000; **376**: 248–51.
- 34 Ding YH, Young CN, Luan X, Li J, Rafols JA, McAllister JP, Ding Y. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropathol* 2005; **109**: 237–46.
- 35 Fontana L, Klein S, Holloszy JO. Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Omaha)* 2010; **32**: 97–108.
- 36 Pedersen BK, Ullum H. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc* 1994; **26**: 140–6.
- 37 McGinnis GR, Ballmann CG, Peters B, Nanayakkara G, Roberts MD, Amin RH, Quindry JC, Nannayakarra G, Roberts MD, Amin RH, Quindry JC. Interleukin-6 mediates exercise preconditioning against myocardial ischemia reperfusion injury. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 2015; **308**: ajpheart.00850.2014.

- 38 Calik MW, Shankarappa SA, Langert KA, Stubbs EB. Forced exercise preconditioning attenuates experimental autoimmune neuritis by altering Th1 lymphocyte composition and egress. *ASN Neuro* 2015; **7** pii: 1759091415595726
- 39 De Lisio M, Baker JM, Parise G. Exercise promotes bone marrow cell survival and recipient reconstitution post-bone marrow transplantation, which is associated with increased survival. *Exp Hematol ISEH - Society for Hematology and Stem Cells*; 2013; **41**: 143–54.
- 40 Ding Y, Li J, Luan X, Ding YH, Lai Q, Rafols JA, Phillis JW, Clark JC, Diaz FG. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. *Neuroscience* 2004; **124**: 583–91.
- 41 Baker JM, De Lisio M, Parise G. Endurance exercise training promotes medullary hematopoiesis. *FASEB J* 2011; **25**: 4348–57.
- 42 Berzosa C, Cebrián I, Fuentes-Broto L, Gómez-Trullén E, Piedrafita E, Martínez-Ballarín E, López-Pingarrón L, Reiter RJ, García JJ. Acute Exercise Increases Plasma Total Antioxidant Status and Antioxidant Enzyme Activities in Untrained Men. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 1–7.
- 43 Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell Elsevier Inc.*; 2014; **159**: 738–49.
- 44 Hayano K, Tian F, Kambadakone AR, Yoon SS, Duda DG, Ganeshan B, Sahani D V, Hospital G, Hospital MG. Global phosphoproteomic analysis of human skeletal muscle reveals a network of exercise regulated kinases and AMPK substrates. *Cell Metab* 2015; **22**: 922–35.
- 45 Simmons SO, Fan CY, Ramabhadran R. Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicol Sci* 2009; **111**: 202–25.
- 46 Zhang Q, Bhattacharya S, Pi J, Clewell RA, Carmichael PL, Andersen ME. Adaptive posttranslational control in cellular stress response pathways and its relationship to toxicity testing and safety assessment. *Toxicol Sci* 2015; **147**: 302–16.
- 47 Schaber J, Baltanas R, Bush A, Klipp E, Colman-Lerner A. Modelling reveals novel roles of two parallel signalling pathways and homeostatic feedbacks in yeast. *Mol Syst Biol* 2012; **8**: 1–17.
- 48 Winter J, Jakob U. Beyond Transcription—New Mechanisms for the Regulation of Molecular Chaperones. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2004; **39**: 297–317.
- 49 Qiang Zhang¹, Jingbo Pi², Courtney G. Woods¹ and MEA. A Systems Biology

- Perspective on Nrf2-Mediated Antioxidant Response. 2010; **244**: 84–97.
- 50 Carapito C, Klemm C, Aebersold R, Domon B. Systematic LC-MS analysis of labile post-translational modifications in complex mixtures. *J Proteome Res* 2009; **8**: 2608–14.
- 51 Laczy B, Hill BG, Wang K, Paterson AJ, White CR, Xing D, Chen Y-F, Darley-Usmar V, Oparil S, Chatham JC. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *AJP Hear Circ Physiol* 2008; **296**: H13–28.
- 52 Lazarus BD, Love DC, Hanover JA. O-GlcNAc cycling: Implications for neurodegenerative disorders. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; **41**: 2134–46.
- 53 Dehennaut V, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Y, Gross B, Walker S, Cacan R, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF. O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G 2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 2007; **282**: 12527–36.
- 54 Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *AJP Endocrinol Metab* 2008; **295**: E17–28.
- 55 Dias WB, Hart GW. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst* 2007; **3**: 766–72.
- 56 Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; **290**: E1–8.
- 57 Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation: A new cancer hallmark? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; **4**: 99.
- 58 Goldberg HJ, Whiteside CI, Hart GW, Fantus IG. Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology* 2006; **147**: 222–31.
- 59 Jackson SP, Tjian R. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 1988; **55**: 125–33.
- 60 Sabire Özcan*, Sreenath S, Andrali and JELC. Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. 2010; **1799**: 353–64.
- 61 Lim K, Chang HI. O-GlcNAc modification of Sp1 inhibits the functional interaction between Sp1 and Oct1. *FEBS Lett* Federation of European Biochemical Societies; 2009; **583**: 512–20.
- 62 Cheng X, Hart GW. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of Serine-16 in murine estrogen receptor. *J Biol Chem* 2001; **276**: 10570–5.

- 63 Butkinaree C, Park K, Hart GW. O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* Elsevier B.V.; 2010; **1800**: 96–106.
- 64 Jay Prakash Singh, Kaisi Zhang, Jing Wu and XY. O-GlcNAc signaling in cancer metabolism and epigenetics. *Fertil Steril* 2015; **356**: 244–50.
- 65 Zachara NE, Hart GW. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2006. **1761**: 599–617.
- 66 Sohn KC, Lee KY, Park JE, Do S II. OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response: A unique defense role of OGT in hyperthermia. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **322**: 1045–51.
- 67 Zachara NE, Cheung W Den, Hart GW. Nucleocytoplasmic glycosylation, O-GlcNAc: identification and site mapping. *Methods Mol Biol* 2004; **284**: 175–94.
- 68 Jones SP, Zachara NE, Ngoh GA, Hill BG, Teshima Y, Bhatnagar A, Hart GW, Marbán E. Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. *Circulation* 2008; **117**: 1172–82.
- 69 Zachara NE, Molina H, Wong KY, Pandey A, Hart GW. The dynamic stress-induced “O-GlcNAc-ome” highlights functions for O-GlcNAc in regulating DNA damage/repair and other cellular pathways. *Amino Acids* 2011; **40**: 793–808.
- 70 Zachara NE, O’Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress: A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem* 2004; **279**: 30133–42.
- 71 Love DC, Ghosh S, Mondoux MA, Fukushige T, Wang P, Wilson MA, Iser WB, Wolkow CA, Krause MW, Hanover JA. Dynamic O-GlcNAc cycling at promoters of *Caenorhabditis elegans* genes regulating longevity, stress, and immunity. *Proc Natl Acad Sci* 2010; **107**: 7413–8.
- 72 Ngoh G a, Facundo HT, Hamid T, Dillmann W, Zachara NE, Jones SP. Unique hexosaminidase reduces metabolic survival signal and sensitizes cardiac myocytes to hypoxia/reoxygenation injury. *Circ Res* 2009; **104**: 41–9.
- 73 Ngoh GA, Watson LJ, Facundo HT, Jones SP, Gladys A. Ngoh, Lewis J. Watson, Heberty T. Facundo and SPJ. Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids* 2011; **40**: 895–911.
- 74 Ngoh GA, Hamid T, Prabhu SD, Jones SP. O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; **297**: H1711–9.

- 75 Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *AJP Cell Physiol* 2008; **294**: C1509–20.
- 76 Nagy T, Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC. Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca²⁺ elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine. *Am J Physiol Physiol* 2006; **290**: C57–65.
- 77 Nöt LG, Marchase RB, Fülöp N, Brocks CA, Chatham JC. Glucosamine administration improves survival rate after severe hemorrhagic shock combined with trauma in rats. *Shock* 2007; **28**: 345–52.
- 78 Groves JA, Lee A, Yildirim G, Zachara NE. Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis. *Cell Stress Chaperones* 2013; **18**: 535–58.
- 79 Hanover JA, Krause MW, Love DC. Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012. **13**: 312–21.
- 80 Lakshmanan T, Hart G. O-GlcNAc : a multifaceted post- translational modification. *BTi* 2004; .
- 81 Kakade PS, Budnar S, Kalraiya RD, Vaidya MM. Functional implications of O-GlcNAcylation-dependent phosphorylation at a proximal site on keratin 18. *J Biol Chem* 2016; **291**: 12003–13.
- 82 Wang Z, Gucek M, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 13793–8.
- 83 Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 2007; **446**: 1017–22.
- 84 Jessica E Rexach, Peter M Clark and LCH-W. Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain. *Nat Chem Biol* 2008; **4**: 97–106.
- 85 Lamarre-Vincent N, Hsieh-Wilson LC. Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: A potential role in gene regulation. *J Am Chem Soc* 2003; **125**: 6612–3.
- 86 Khidekel N, Ficarro SB, Clark PM, Bryan MC, Swaney DL, Rexach JE, Sun YE, Coon JJ, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat Chem Biol* 2007; **3**: 339–48.
- 87 Lefebvre T, Caillet-Boudin M-L, Buée L, Delacourte A, Michalski J-C. O-GlcNAc glycosylation and neurological disorders. *Adv Exp Med Biol* 2003; **535**: 189–202.

- 88 Deng Y, Li B, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Brandt R, Gong C-XCC-X. Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *FASEB J* 2008; **22**: 138–45.
- 89 Zhu Y, Shan X, Yuzwa SA, Vocadlo DJ. The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2014; **289**: 34472–81.
- 90 Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu JJ, Gu JJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 2009; **132**: 1820–32.
- 91 Graham DL, Gray AJ, Joyce JA, Yu D, O'Moore J, Carlson GA, Shearman MS, Dellovade TL, Hering H. Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology* Elsevier Ltd; 2014; **79**: 307–13.
- 92 Yuzwa SA, Shan X, MacAuley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K, Vocadlo DJ. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat Chem Biol* Nature Publishing Group; 2012; **8**: 393–9.
- 93 Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong C-X. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* National Acad Sciences; 2004; **101**: 10804–9.
- 94 Jensen RV, Johnsen J, Kristiansen SB, Zachara NE, Bøtker HE, Vibjerg Jensen R, Johnsen J, Buus Kristiansen S, Zachara NE, Bøtker HE. Ischemic preconditioning increases myocardial O-GlcNAc glycosylation. *Scand Cardiovasc J* 2013; **47**: 168–74.
- 95 Liu J, Marchase RB, Chatham JC. Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels. *J Mol Cell Cardiol* 2007; **42**: 177–85.
- 96 Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *AJP Cell Physiol* 2008; **294**: C1509–20.
- 97 Chatham JC, Marchase RB. The role of protein O-linked β -N-acetylglucosamine in mediating cardiac stress responses. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* Elsevier B.V.; 2010; **1800**: 57–66.
- 98 Belke DD. Swim-exercised mice show a decreased level of protein O-GlcNAcylation and expression of O-GlcNAc transferase in heart. *J Appl Physiol* 2011; **111**: 157–62.
- 99 Bennett CE, Johnsen VL, Shearer J, Belke DD. Exercise training mitigates aberrant cardiac protein O-GlcNAcylation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sci*

- Elsevier Inc.; 2013; **92**: 657–63.
- 100 Cox EJ, Marsh SA. Exercise and diabetes have opposite effects on the assembly and O-GlcNAc modification of the mSin3A/HDAC1/2 complex in the heart. *Cardiovasc Diabetol Cardiovascular Diabetology*; 2013; **12**: 101.
- 101 Hortemo KH, Lunde PK, Anonsen JH, Kvaløy H, Munkvik M, Rehn TA, Sjaastad I, Lunde IG, Aronsen JM, Sejersted OM. Exercise training increases protein O-GlcNAcylation in rat skeletal muscle. *Physiol Rep* 2016; **4**: e12896.
- 102 Peterelj TT, Marsh S a., Strobel N a., Matsumoto A, Briskey D, Dalbo VJ, Tucker PS, Coombes JS. Glutathione depletion and acute exercise increase O-GlcNAc protein modification in rat skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 2014; **400**: 265–75.
- 103 Medford HM, Porter K, Marsh SA. Immediate effects of a single exercise bout on protein O-GlcNAcylation and chromatin regulation of cardiac hypertrophy. *AJP Hear Circ Physiol* 2013; **305**: H114–23.
- 104 Brown JR, Crawford BE, Esko JD. Glycan antagonists and inhibitors: A fount for drug discovery. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2007;. **42**: 481–515.
- 105 van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2008; **9**: 593–601.
- 106 Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2007; **7**: p. 255–66.
- 107 Wolfert, M; Boons G. Adaptive immune activation: Glycosylation does matter. *Nat Chem Biol* 2013; **9**: 776–84.
- 108 Purcell AW, Van Driel IR, Gleeson PA. Impact of glycans on T-cell tolerance to glycosylated self-antigens. *Immunol Cell Biol* 2008; **86**: 574–9.
- 109 Petersen J, Purcell AW, Rossjohn J. Post-translationally modified T cell epitopes: Immune recognition and immunotherapy. *J Mol Med* 2009; **87**: 1045–51.
- 110 Kearse KP, Hart GW. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins (O-linked N-acetylglucosamine/nucleoplasmic and cytoplasmic glycosylation/Pro-Glu-Ser/Thr regions). *Biochemistry* 1991; **88**: 1701–5.
- 111 Golks A, Guerini D. The O-linked N-acetylglucosamine modification in cellular signalling and the immune system. “Protein modifications: Beyond the usual suspects” review series. *EMBO Rep* 2008; **9**: 748–53.
- 112 Pappa A, Guerini D. Immune Regulation by the Posttranslational Modification O-GlcNAc. *Curr Signal Transduct Ther* 2010; **5**: 41–8.

- 113 Brolinson PG, Elliott D. Exercise and the Immune System. *Clin Sports Med* 2007; **26**: 311–9.
- 114 Liu D, Wang R, Grant AR, Zhang J, Gordon PM, Wei Y, Chen P. Immune adaptation to chronic intense exercise training: new microarray evidence. *BMC Genomics* 2017; **18**: 1–10.
- 115 Nieman DC. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on systemic immunity. *Immunol Cell Biol* 2000; **78**: 496–501.
- 116 Walsh NP, Gleeson MM, Shephard RJ, Jeffrey MG, Woods A, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen K, Hoffman-goetz L, Rogers CJ, Woods JA, Pedersen BK, Northoff H, Abbasi A, Simon P. Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 2011; **17**: 6–63
- 117 Handzlik MK, Shaw AJ, Dungey M, Bishop NC, Gleeson M. The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *Eur J Appl Physiol* 2013; **113**: 1839–48.
- 118 Nieman DC, Buckley KS, Henson DA, Warren BJ, Suttles J, Ahle JC, Simandle S, Fagoaga OR, Nehlsen-Cannarella SL. Immune function in marathon runners versus sedentary controls. *Med Sci Sports Exerc* 1995; **27**: 986–92.
- 119 Hack V, Strobel G, Weiss M, Weicker H. PMN cell counts and phagocytic activity of highly trained athletes depend on training period. *J Appl Physiol* 1994; **77**: 1731–5.
- 120 Nieman DC, Simondie S, Henson DA, Warren BJ, Suttles J, Davis JM, Buckley KS, Ahle JC, Butterworth DE, Fagoaga OR, Nehlsen-Cannarella SL. Lymphocyte proliferative response to 2.5 hours of running. *Int J Sports Med* 1995; **16**: 404–9.
- 121 Chetsawang J, Govitrapong P, Chetsawang B. Hydrogen Peroxide Toxicity Induces Ras Signaling in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cultured Cells. *J Biomed Biotechnol* 2010; **2010**: 1–4.
- 122 Army/US. Army Physical Readiness Training. Department of the Army; 2012. p. Appendix A1--24.
- 123 Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW. Perturbations in O-linked β -N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem* 2005; **280**: 32944–56.
- 124 Fujiki R, Chikanishi T, Hashiba W, Ito H, Takada I, Roeder RG, Kitagawa H, Kato S. GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature* Nature Publishing Group; 2009; **459**: 455–9.
- 125 Wang Z, Pandey A, Hart GW. Dynamic interplay between O-linked N-

- acetylglucosamylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* 2007; **6**: 1365–79.
- 126 Liu J, Pang Y, Chang T, Bounelis P, Chatham JC, Marchase RB. Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2006; **40**: 303–12.
- 127 Nagy T, Miseta A, Kovacs L. Protein-associated O-GlcNAc, a multifunctional mechanism in cell signaling and its role in the pathogenesis of diabetes, stress and malignant diseases. *Biochem Medica* 2007; **17**: 162–77.
- 128 Kommaddi RP, Dickson KM, Barker P a. Stress-induced expression of the p75 neurotrophin receptor is regulated by O-GlcNAcylation of the Sp1 transcription factor. *J Neurochem* 2011; **116**: 396–405.
- 129 Zheng GM, Yu C, Yang Z. Puerarin suppresses production of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced N9 microglial cells through regulating MAPK phosphorylation, O-GlcNAcylation and NF- κ B translocation. *Int J Oncol* 2012; **40**: 1610–8.
- 130 Cheung WD, Hart GW. AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J Biol Chem* 2008; **283**: 13009–20.
- 131 Su B, Wang X, Lee H-G gon, Tabaton M, Perry G, Smith MA, Zhu X. Chronic oxidative stress causes increased tau phosphorylation in M17 neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 2010; **468**: 267–71.
- 132 Luque-Contreras D, Carvajal K, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Campos-Peña V. Oxidative stress and metabolic syndrome: Cause or consequence of Alzheimer’s disease? *Oxid Med Cell Longev* Hindawi Publishing Corporation; 2014; **2014**: 1–11.
- 133 Verdile G, Fuller SJ, Martins RN. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* Elsevier B.V.; 2015; **84**: 22–38.
- 134 Faude O, Kindermann W, Meyer T. Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sports Med* 2009; **39**: 469–90.
- 135 Kazemi Z, Chang H, Haserodt S, McKen C, Zachara NE. O-Linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Regulates Stress-induced Heat Shock Protein Expression in a β GSK-3 -dependent Manner. *J Biol Chem* 2010; **285**: 39096–107.
- 136 Nagy T, Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC. Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca²⁺ elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;

- 290:** C57–65.
- 137 Kátaí E, Pál J, Poór VSVSVS, Purewal R, Miseta A, Nagy T. Oxidative stress induces transient O-GlcNAc elevation and tau dephosphorylation in SH-SY5Y cells. *J Cell Mol Med* 2016; **20**: 2269–77.
- 138 Myslicki JP, Shearer J, Hittel DS, Hughey CC, Belke DD. O-GlcNAc modification is associated with insulin sensitivity in the whole blood of healthy young adult males. *Diabetol Metab Syndr* 2014; **6**: 96.
- 139 Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* 2007; **103**: 693–9.
- 140 Accattato F, Greco M, Pullano SA, Carè I, Fiorillo AS, Pujia A, Montalcini T, Foti DP, Brunetti A, Gulletta E. Effects of acute physical exercise on oxidative stress and inflammatory status in young, sedentary obese subjects. *PLoS One* 2017; **12**: e0178900.
- 141 Shek P, Shephard R. Physical exercise as a human model of limited inflammatory response. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; **597**: 589–97.
- 142 Santos SA, Silva ET, Caris A V., Lira FS, Tufik S, dos Santos RVT. Vitamin E supplementation inhibits muscle damage and inflammation after moderate exercise in hypoxia. *J Hum Nutr Diet* 2016; **29**: 516–22.
- 143 Shephard RJ. Development of the discipline of exercise immunology. *Exerc Immunol Rev* 2010; **16**: 194–222.
- 144 Kettle AG. Leukocytosis induced by exercise. 1987; **295**: 1135–6.
- 145 Gale D, Fleetwood JA, Weddell ANN, Ellis RD. Fitness, unfit, and phosphate. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987; **294**: 939.
- 146 Gjevestad GO, Holven KB, Ulven SM. Effects of Exercise on Gene Expression of Inflammatory Markers in Human Peripheral Blood Cells: A Systematic Review. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 2015; **9**.
- 147 Sakharov DA, Maltseva D V., Riabenko EA, Shkurnikov MU, Northoff H, Tonevitsky AG, Grigoriev AI, Kraemer WJ. Passing the anaerobic threshold is associated with substantial changes in the gene expression profile in white blood cells. *Eur J Appl Physiol* 2012; **112**: 963–72.
- 148 Belotto MF, Magdalon J, Rodrigues HG, Vinolo M a R, Curi R, Pithon-Curi TC, Hatanaka E. Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. *Clin Exp Immunol* 2010; **162**: 237–43.
- 149 Liu H, Wang Z, Yu S, Xu J. Proteasomal degradation of O-GlcNAc transferase elevates hypoxia-induced vascular endothelial inflammatory response. *Cardiovasc Res*

- 2014; **103**: 131–9.
- 150 Zhang D, Cai Y, Chen M, Gao L, Shen Y, Huang Z. OGT-mediated O-GlcNAcylation promotes NF- κ B activation and inflammation in acute pancreatitis. *Inflamm Res* Springer Basel; 2015; **64**: 943–52.
- 151 Nöt LG1, Brocks CA, Vámhidy L, Marchase RB CJ. Increased O-linked β -N-acetylglucosamine levels on proteins improves survival, reduces inflammation and organ damage 24 hours after trauma-hemorrhage in rats. 2010; **38**: 562–71.
- 152 Xing D, Gong K, Feng W, Nozell SE, Chen YF, Chatham JC, Oparil S. O-GlcNAc modification of nfkb p65 inhibits tnf- α -induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One* 2011; **6**: e24021
- 153 Kneass ZT, Marchase RB. Protein O-GlcNAc modulates motility-associated signaling intermediates in neutrophils. *J Biol Chem* 2005; **280**: 14579–85.
- 154 Johnson B, Opimba M, Bernier J. Implications of the O-GlcNAc modification in the regulation of nuclear apoptosis in T cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* Elsevier B.V.; 2014; **1840**: 191–8.
- 155 Golks A, Tran T-TT, Goetschy JF, Guerini D, Alexander Golks, Thi-Thanh Thao Tran JFG and DG, Golks A, Tran T-TT, Goetschy JF, Guerini D. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *EMBO J* 2007; **26**: 4368–79.
- 156 Yang WH, Park SY, Nam HW, Kim DH, Kang JG, Kang ES, Kim YS, Lee HC, Kim KS, Cho JW. NF B activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc Natl Acad Sci* 2008; **105**: 17345–50.
- 157 Zou L, Yang S, Champattanachai V, Hu S, Chaudry IH, Marchase RB, Chatham JC, Jc C. Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O -GlcNAcylation and attenuation of NF- κ B signaling. 2009; **5**: 515–23.
- 158 Lund PJ, Elias JE, Davis MM. Global Analysis of O -GlcNAc Glycoproteins in Activated Human T Cells. *J Immunol* 2016; **197**: 3086–98.
- 159 Springhorn C, Matsha TE, Erasmus RT, Essop MF. Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; **97**: 4640–9.
- 160 AS Madsen-Bouterse1, Y Xu1, HR Petty2 and RR, Madsen-Bouterse SA, Xu Y, Petty HR, Romero R. Quantification of O-GlcNAc protein modification in neutrophils by flow cytometry. *Cytom Part A* 2008; **73**: 667–72.
- 161 Kneass ZT, Marchase RB. Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in

- protein-associated O-GlcNAc. *J Biol Chem* 2004; **279**: 45759–65.
- 162 Peter Adams O. The impact of brief high-intensity exercise on blood glucose levels. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* 2013; **6**: 113–22.
- 163 Taylor RP, Parker GJ, Hazel MW, Soesanto Y, Fuller W, Yazzie MJ, McClain DA. Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 2008; **283**: 6050–7.
- 164 Park K, Saudek CD, Hart GW. Increased expression of β -N-acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes. *Diabetes* 2010; **59**: 1845–50.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

Káta E, Pál J, Poór VS, Purewal R, Miseta A, Nagy T. *Oxidative stress induces transient O-GlcNAc elevation and tau dephosphorylation in SH-SY5Y cells*. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2016 Dec; 20(12): 2269–2277. IF: 4,499

Tamás Nagy, **Emese Káta**, Viktória Fisi, Tamás Tibor Takács, Antal Stréda, István Wittmann, Attila Miseta. *Protein O-GlcNAc Modification Increases in White Blood Cells After a Single Bout of Physical Exercise*. Front Immunol. 2018 May 3;9:970. IF: 5,511 (2017)

Összesített impakt faktor: 10,01

EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

Fisi V, **Káta**i E, Orbán J, Dossena S, Miseta A, Nagy T. *O-Linked N-Acetylglucosamine Transiently Elevates in HeLa Cells during Mitosis*. *Molecules*. 2018 May 26;23(6). IF: 2,861

Tóth A, **Káta**i E, Kálmán E, Bogner P, Schwarcz A, Dóczy T, Sík A, Pál J. *In vivo detection of hyperacute neuronal compaction and recovery by MRI following electric trauma in rats*. *J Magn. Reson. Imaging*. 2016 Oct;44(4):814-22. IF: 3,083

Szélig L, Kun S, Woth G, Molnár GA, Zrínyi Z, **Káta**i E, Lantos J, Wittmann I, Bogár L, Miseta A, Csontos C. *Time courses of changes of para-, meta-, and ortho-tyrosine in septic patients: A pilot study*. *Redox Rep*. 2016 Jul;21(4):180-9. IF: 2,07

Fisi V, **Káta**i E, Bogner P, Miseta A, Nagy T. *Timed, sequential administration of paclitaxel improves its cytotoxic effectiveness in a cell culture model*. *Cell Cycle*. 2016 May 2;15(9):1227-33. IF: 3,53

Nagy T, Frank D, **Káta**i E, Yahiro RK, Poór VS, Montskó G, Zrínyi Z, Kovács GL, Miseta A. *Lithium induces ER stress and N-glycan modification in galactose-grown Jurkat cells*. *PLoS One*. 2013 Jul 22;8(7):e70410. IF: 3,534

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 25,088

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Nagy Tamásnak az elmúlt években nyújtott támogatásáért és türelméért. Hálás vagyok, hogy kutatócsoportjába befogadott, szakmailag és emberileg is biztatott, hasznos tanácsai mind a kutatói munkában, mind az oktatásban értékesnek bizonyultak.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Miseta Attilának és Prof. Dr. Kovács L. Gábornak, hogy hozzájárultak a PhD értekezéséül szolgáló munkám támogatásához. A dolgozat és az abban szereplő kísérletek anyagi támogatásáért köszönet illeti a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 számú "Peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségek kialakulásában" című pályázatot.

Köszönetemet fejezem ki közvetlen munkatársaimnak, akikkel a Laboratóriumi Medicina Intézetben, illetve a Szentágotthai Kutatóközpontban együtt dolgozhattam.

Nagyon köszönöm Dr. Orbán Józsefnek a konfokális mikroszkópban nyújtott segítségét. Hálás vagyok Dr. Pál Józsefnek a baráti támogatásért, építő jellegű kritikáiért, melyeket a dolgozat megírásában nyújtott.

Szívből köszönöm Dr. Fisi Viktória kolléganőmnek értékes szakmai tanácsait és javaslatait. Ugyanakkor köszönöm, hogy barátként is mindig számíthattam rá.

Végezetül, nagyon köszönöm a családomnak a támogatást, hogy lehetővé tették tanulmányaimat. Hálás vagyok a megértésükért, biztatásukért, olykor noszogatásukért, melyek nélkül a dolgozat nem készülhetett volna el. Nagyon köszönöm páromnak a türelmet, szeretetet és támogató hozzáállását!

Oxidative stress induces transient O-GlcNAc elevation and tau dephosphorylation in SH-SY5Y cells

Emese Kátai ^a, József Pál ^{b, c}, Viktor Soma Poór ^d, Rupeena Purewal ^e, Attila Miseta ^a,
Tamás Nagy ^{a, f, *}

^a Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Pécs, Hungary

^b Department of Neurosurgery, University of Pécs, Pécs, Hungary

^c Neuronal Networks Group, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, UK

^d Department of Forensic Medicine, University of Pécs, Pécs, Hungary

^e Department of Pediatrics, West Virginia University, Morgantown, WV, USA

^f János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary

Received: January 27, 2016; Accepted: May 19, 2016

Abstract

O-linked β -*N*-acetylglucosamine or O-GlcNAc modification is a dynamic post-translational modification occurring on the Ser/Thr residues of many intracellular proteins. The chronic imbalance between phosphorylation and O-GlcNAc on tau protein is considered as one of the main hallmarks of Alzheimer's disease. In recent years, many studies also showed that O-GlcNAc levels can elevate upon acute stress and suggested that this might facilitate cell survival. However, many consider chronic stress, including oxidative damage as a major risk factor in the development of the disease. In this study, using the neuronal cell line SH-SY5Y we investigated the dynamic nature of O-GlcNAc after treatment with 0.5 mM H₂O₂ for 30 min. to induce oxidative stress. We found that overall O-GlcNAc quickly increased and reached peak level at around 2 hrs post-stress, then returned to baseline levels after about 24 hrs. Interestingly, we also found that tau protein phosphorylation at site S262 showed parallel, whereas at S199 and PHF1 sites showed inverse dynamic to O-Glycosylation. In conclusion, our results show that temporary elevation in O-GlcNAc modification after H₂O₂-induced oxidative stress is detectable in cells of neuronal origin. Furthermore, oxidative stress changes the dynamic balance between O-GlcNAc and phosphorylation on tau proteins.

Keywords: O-GlcNAc • oxidative stress • stress response • Alzheimer's disease • tau phosphorylation

Introduction

Cells maintain their intracellular milieu within a quite narrow range. This is a dynamic equilibrium which stabilizes the cells' internal environment in response to the alterations of external conditions. Cells exposed to any damage react with a complex mechanism called stress response which varies by the actual tolerance level of the given cell type and the duration and severity of the stress [1]. When the impairment of the cells does not cause immediate cell death (necrosis), the cells may recover and adapt to the changed environment [2]. When complete adaptation is not possible, stress response will include hypertrophy, hyperplasia, atrophy and metaplasia or activation of death signalling pathways: apoptosis, necrosis or autophagy

cell death [1, 3, 4]. Not surprisingly, dysfunctions of the adaptive mechanisms play an important role in many diseases such as ischaemia, diabetes, atherosclerosis, neurodegenerative disorders and tumours.

Stress response induces and regulates a variety of intracellular adaptive mechanisms ranging from receptor binding, signal transduction, gene transcription to protein synthesis [5]. These mechanisms contribute to the survivability of the cells by controlling cell cycle, repairing/stabilizing functional proteins, removing of damaged molecules, mobilizing stored resources and modifying metabolic pathways [3, 6, 7]. Cellular proteins are regulated in these processes at multiple levels; altered protein degradation (*e.g.* activation of caspases) or synthesis (transcriptional changes, unfolded protein response) and functional changes [8–10]. Post-translational modifications such as phosphorylation, glycosylation and acetylation also play a critical role

*Correspondence to: Tamás NAGY
E-mail: nagy.tamas@pte.hu

in these processes, as they can reversibly or irreversibly modify the structure, the stability and the function of proteins [11].

Recently, several studies indicated the involvement of a special post-translational modification in stress response: O-linked β -*N*-acetylglucosamine or O-GlcNAc modification [12, 13]. Upon O-GlcNAc modification, a single *N*-acetylglucosamine is attached to the hydroxyl group of serine or threonine moieties of cytosolic and nuclear proteins [14]. This modification is a dynamic and reversible process and was shown to impact so far more than 1000 cytoplasmic, nuclear and mitochondrial proteins such as NF- κ B, PI3-kinase, endothelial nitric oxide synthase, O-GlcNAc transferase (OGT), α -tubulin, c-myc and heat shock protein 70 [15, 16]. It plays a critical role in the regulation of signal transduction, transcriptional activity, cell-cycle regulation, protein degradation and glucose metabolism [15]. Previous studies have shown that increased O-GlcNAc has a protective role in acute stress, best characterized in cardiac cells [17]. Recent findings suggest that O-GlcNAc is also abundant in neuronal tissues [18] and it was shown that chronic imbalance between O-GlcNAc and phosphorylation on tau proteins is a major element in the pathophysiology of Alzheimer's disease [19]. Although it was shown that O-GlcNAc is dynamic and is induced by excitatory neuronal stimuli [18], the regulation of O-GlcNAc during acute stress in neuronal cells is far from completely understood.

The aim of this study was to investigate the dynamic change in O-GlcNAc in the neuronal cell line SH-SY5Y after H₂O₂-induced oxidative stress. We found that intracellular O-GlcNAc rapidly elevated after treatment with 0.5 mM H₂O₂ for 30 min., reached peak level then declined close to the basal level. Moreover, reciprocal relationship between O-GlcNAc and phosphorylation of tau protein after oxidative stress was directly demonstrated. These findings suggest that the pathophysiology of neurodegenerative diseases might be connected to cellular stress adaptation mechanisms.

Materials and methods

Cell line and culture conditions

SH-SY5Y neuroblastoma cells (ATCC CRL-2266 human neuroblastoma) were grown in a 1:1 mixture of EMEM and Ham's F12 medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acids, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 μ g/ml). The cells were incubated at 37°C, in 95% air–5% CO₂ atmosphere in a humidified incubator. Subculturing was performed in every 2–3 days and fresh medium was replaced 12–24 hrs prior to each experiment. The experiments were performed on the cells at 80% or less confluency. Oxidative conditions were chosen based on experimental set-ups found in the literature [20, 21] and our pilot experiments (data not shown). Our aim was to decrease the viability to ~75% by the treatment. Thus, cells were treated with 0.5 mM H₂O₂ for 30 min. in serum-free medium to avoid rapid H₂O₂ degradation by antioxidants present in FBS. After the treatment, the medium was replaced by complete medium and the cells were incubated as described above for the following recovery times: 0, 30, 60 min. and 2, 4, 24, 48 and 72 hrs.

Western blot analysis

The treated cells were washed twice in ice-cold PBS buffer and harvested in RIPA buffer [10 mM Tris pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), 0.1% SDS, 1% Triton-X 100, 0.5% deoxycholate, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail: 1 tablet/10 ml (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)], kept on ice for 30 min. and centrifuged for 10 min. at 4°C at 14,000 \times g. From the supernatant the total protein concentration was determined using Bio-Rad Dc Assay Kit. Proteins were separated on 7.5% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). The same amount of protein of each sample was confirmed by SYPRO Ruby Protein Blot Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) on the membranes. Blots were probed with the anti-O-GlcNAc antibody CTD110.6 (monoclonal mouse IgM, 1:2000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 1% casein blocking buffer and followed with HRP conjugated goat antimouse IgM (1:5000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Blots were also probed with mouse (monoclonal) anti-tau antibody (1:250) and rabbit (polyclonal) anti-tau [Ps¹⁹⁹] phospho-specific antibody (1:1000; Thermo Fisher Scientific), rabbit (polyclonal) anti-tau [Ps²⁶²] antibody (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA) and PHF1 (anti-tau Ps^{396/404}) (1:200; gift from Dr. P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA) according to the manufacturer's protocol. The blots were developed using Femto chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific) and the signal was visualized by Kodak Image Station 2000R. Kodak 1D and ImageJ analysis software were used to quantify the intensity of bands.

Cell viability test

Cells were lifted by trypsin and quickly washed 2 \times in ice-cold PBS. Approximately 10⁶ cells/sample were stained with Propidium Iodide and Annexin V-FITC according to the manufacturer's instruction (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany). The fluorescence signal of Propidium-Iodide dye was detected at FL3 channel (620 nm), and FITC Annexin V intensity was detected at FL1 channel (525 nm) with a Cytomic FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Defining the quadrants of dead cells (positive for propidium iodide) and live cells (minimal staining for both Propidium Iodide and FITC Annexin V) was performed on control samples and identical boundaries were utilized for all samples.

Intracellular ROS detection

Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured by fluorescence using CM-H2DCFDA (Thermo Fisher Scientific) fluorescence dye as a ROS probe. SH-SY5Y cells were cultured as mentioned above. Before the experiments, the cells were lifted from the flasks by 0.25% trypsin/0.5 mM EDTA/PBS then immediately washed with pre-warmed complete media to neutralize trypsin. Next, the cells were quickly washed in Hank's balanced salt solution (HBSS), and resuspended in HBSS containing 1% bovine serum albumin, 1.2 mM Ca²⁺, 1.0 mM Mg²⁺ and 2 μ M CM-H2DCFDA. Samples were incubated in the dark at room temperature for 30 min. Cell suspensions were gently mixed every 10 min. during the incubation to prevent the attachment to the vessels' wall. Following two wash steps to remove the excess of the

fluorescence dye, the cells were resuspended in HBSS. Fluorescence signal was measured at 25°C by F4500 fluorescence spectrophotometer (Hitachi High-Technologies Europe, Krefeld, Germany) at excitation wavelength of 490 nm and emission wavelength of 525 nm. Baseline level of fluorescence was recorded for ~1 min. before the addition of 0.5 mM H₂O₂ or vehicle. The relative level of ROS was expressed as F/F₀ values. Fluorescence signal was monitored for 10 min. following peroxide or vehicle treatment.

Real-time RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from SH-SY5Y neuroblastoma cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA quantity was determined using a Nanodrop Implen Nanophotometer. Reverse transcription into cDNA was performed with iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Pre-designed TaqMan assay (Roche Applied Science) was used to determine mRNA expression levels of human OGT and glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (GFAT). As a reference gene, human porphobilinogen deaminase (PBGD) was used. Amplification primers and hydrolysis probes were designed using ProbeFinder software (www.universalprobelibrary.com). Sequences of the forward and reverse primers of OGT were 5'-AGACGATGGCACAACTCC-3' and 5'-ATCAGCTGCTTTCCATTGC-3', the hydrolysis probe was UPL #29. Sequences of the forward and reverse primers of GFAT were 5'-TGAGATTGGTGTGGCCAGTA-3' and 5'-GGCAAA-CATCACAAGGGATAC-3', the hydrolysis probe was U PL #20. The sequences of the reference gene PBGD were as follows: sense 5'-TGCCA-GAGAAGAGTGTGGTG-3', antisense 5'-AGCCGGGTGTTGAGGTTT-3', the hydrolysis probe was UPL #24. Real-time PCR was performed in a Light-Cycler[®] thermal cycler (Roche Applied Science). Each reaction was performed in a 20 µl volume, using the LightCycler Taqman Master Mix (Roche Applied Science). Both target and reference genes were amplified with efficiencies near 100% and within 5% of each other. For the relative gene expression analysis, the 2 $\Delta\Delta$ Ct (Livak) method was used. The expression level of the gene of interest was compared with the level of PBGD in each sample.

Immunofluorescence microscopy

Cells were grown on coverslips and after oxidative stress/recovery treatments they were washed twice in ice-cold PBS. Next, the cells were fixed in 10% PBS-buffered formaldehyde for 30 min. at room temperature, subsequently washed with PBS. To avoid formaldehyde autofluorescence, the coverslips were quenched with 50 mM ammonium chloride for 10 min. Cells were permeabilized with 0.1% Triton-X 100 for 5 min. Non-specific sites were blocked with 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) in PBS for 5 min. and then the coverslips were incubated at room temperature with CTD110.6 monoclonal antibody for 30 min. at a dilution of 1:100 in 5% BSA/PBS. After rinsing three times with PBS, the samples were incubated with Alexa Fluor 594 goat antimouse IgM secondary antibody (1:200; Thermo Fisher Scientific) for 30 min. in dark. Nuclei were counterstained with Hoechst dye at a dilution of 1:5000 for 15 min. at room temperature. Finally, coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) mounting medium. Image acquisition was performed with a Zeiss Axiovert 35 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) inverted fluorescent microscope with CellD (Olympus, Tokyo, Japan) software.

Data analysis

Data are presented as means \pm S.E.M. throughout. Comparisons were performed with repeated measures one-way ANOVA and statistically significant differences between groups were defined as $P < 0.05$ and are indicated in the legends of figures.

Results

Effect of treatment with 0.5 mM H₂O₂ for 30 min. on cell survival

We have used H₂O₂ to expose SH-SY5Y neuroblastoma cells to oxidative stress. Figure 1A shows that the addition of 0.5 mM H₂O₂ markedly increased the level of intracellular ROS as measured by the ROS sensitive fluorescent dye CM-H2DCFDA. To simulate acute oxidative stress and subsequent recovery, we exposed the cells to 0.5 mM H₂O₂ for 30 min. and then carefully washed out the oxidative agent from the medium to allow the cells to recover (Fig. 1B). Intracellular ROS levels were also assessed at various timepoints (1–6 hrs) after the removal of H₂O₂ from the media, but no significant difference could be found between control and H₂O₂-treated cells (data not shown). Next, the cells were incubated under normal growth conditions for up to 72 hrs. The damage caused by oxidative stress was fully apparent at 24 hrs after the treatment (the ratio of dead cells increased to 22.6 (\pm 7.3) % compared to 6.7 (\pm 2.5) % of the control). The ratio of dead cells did not increase any further (22.3 (\pm 7.1) % and 15.8 (\pm 5.0) % after 48 and 72 hrs, respectively).

Immunofluorescence microscopy reveals dynamic changes in protein O-GlcNAcylation

To assess the effect of oxidative stress induced by 30 min. treatment with 0.5 mM H₂O₂ on protein O-glycosylation, SH-SY5Y cells were formalin fixed and labelled with anti-O-GlcNAc monoclonal antibody (CTD110.6) after exposing them to conditions analogous to the cell survival experiments. Figure 2 shows control and stress-exposed cells after various recovery times. Similar to other cell types, SH-SY5Y cells showed abundant, diffuse granular cytoplasmic CTD110.6 positivity. Whereas each cell seemed to increase its overall O-GlcNAc levels upon stress, we found some very intensely labelled cells that also appeared to have more compact and round-shaped morphology. Based on Hoechst nuclear counterstaining, these cells were either mitotic cells or apoptotic cells, the latter more frequently appearing in the late post-stress phase (data not shown). Fluorescence intensity was averaged for all experimental conditions and is summarized in the bar graph shown at the right of Figure 2. Although no significant increase in intensity was observed at 2 hrs compared with control, we found significant changes within stress-exposed cells as recovery time progressed.

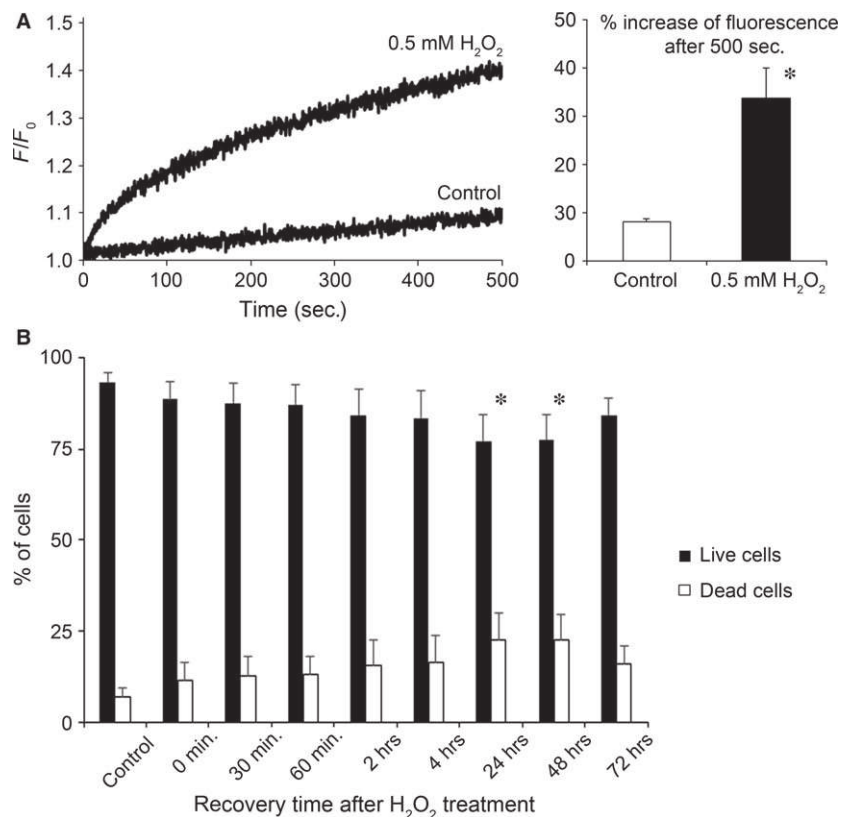


Fig. 1 Effect of moderate oxidative stress on cell viability. **(A)** Intracellular ROS levels measured by ROS sensitive fluorescent dye CM-H2DCFDA. SH-SY5Y cells were treated with either 0.5 mM H₂O₂ or vehicle (control) starting at 0 sec. and the change in fluorescence signal was recorded for 500 sec. Representative curves of relative fluorescence (F/F₀) are shown on the left, whereas the average increase in fluorescence signal 500 sec. after the start of the experiment is shown on the right. Data are means ± S.E.M. from three independent experiments. **P* < 0.05 versus control. **(B)** SH-SY5Y cells were treated with 0.5 mM H₂O₂ for 30 min. in serum-free growth medium, then the medium was replaced and cells were incubated under normal growth conditions. The indicated times refer to the recovery time after the end of H₂O₂ treatment. At those time points, cells were collected and cell viability assay was performed to measure the percentage of living cells (Annexin V and Propidium-Iodide negative) and dead cells (Propidium-Iodide positive). Data are means ± S.E.M. from eight independent experiments. **P* < 0.05 versus control.

Elevation in O-GlcNAc protein and decrease/reduce in protein phosphorylation

The dynamic changes in O-GlcNAc levels demonstrated by immunofluorescence were confirmed by immunoblots. We found that SH-SY5Y cells required about 2–4 hrs to reach peak level of O-GlcNAc following oxidative stress induced by 30 min. treatment with 0.5 mM H₂O₂. On the long run, O-GlcNAc levels returned to normal intensities after about 24–48 hrs (Fig. 3).

Many studies have shown an interaction between O-GlcNAc and other signalling mechanisms, the most documented one is the reciprocal relationship between O-GlcNAc and phosphorylation, particularly on tau proteins which play a key role in the development of Alzheimer's disease [22]. As of today, scientific consensus agrees that proper O-GlcNAcylation can prevent the hyperphosphorylation of tau proteins and subsequent formation of neurofibrillary tangles [23]. In this study, we analysed the level of tau phosphorylation (Fig. 3B) using an antibody against total tau and phosphospecific antibody

against tau [Ps¹⁹⁹], [Ps²⁶²] and PHF1. We found that the ratio of tau [Ps¹⁹⁹] and PHF1 compared with the amount of total tau protein level significantly decreased after oxidative stress induced by 30 min. treatment with 0.5 mM H₂O₂. After 24–72 hrs of recovery times, both [Ps¹⁹⁹] tau and PHF1 phosphorylation returned to baseline levels, which dynamic seems to be the opposite of the overall O-GlcNAc levels' dynamic. On the other hand, [Ps²⁶²] phosphorylation seemed to follow a parallel dynamic to O-GlcNAcylation; short-term elevation after oxidative stress followed by decreased level of phosphorylation during the recovery phase.

Real-time PCR analysis of GFAT and OGT mRNA expression in SH-SY5Y neuronal cell culture

Protein O-GlcNAc modification is regulated by OGT which is the only enzyme responsible to the addition of the *N*-acetyl-glucosamine moiety to Ser/Thr residues. However, metabolic flux through the

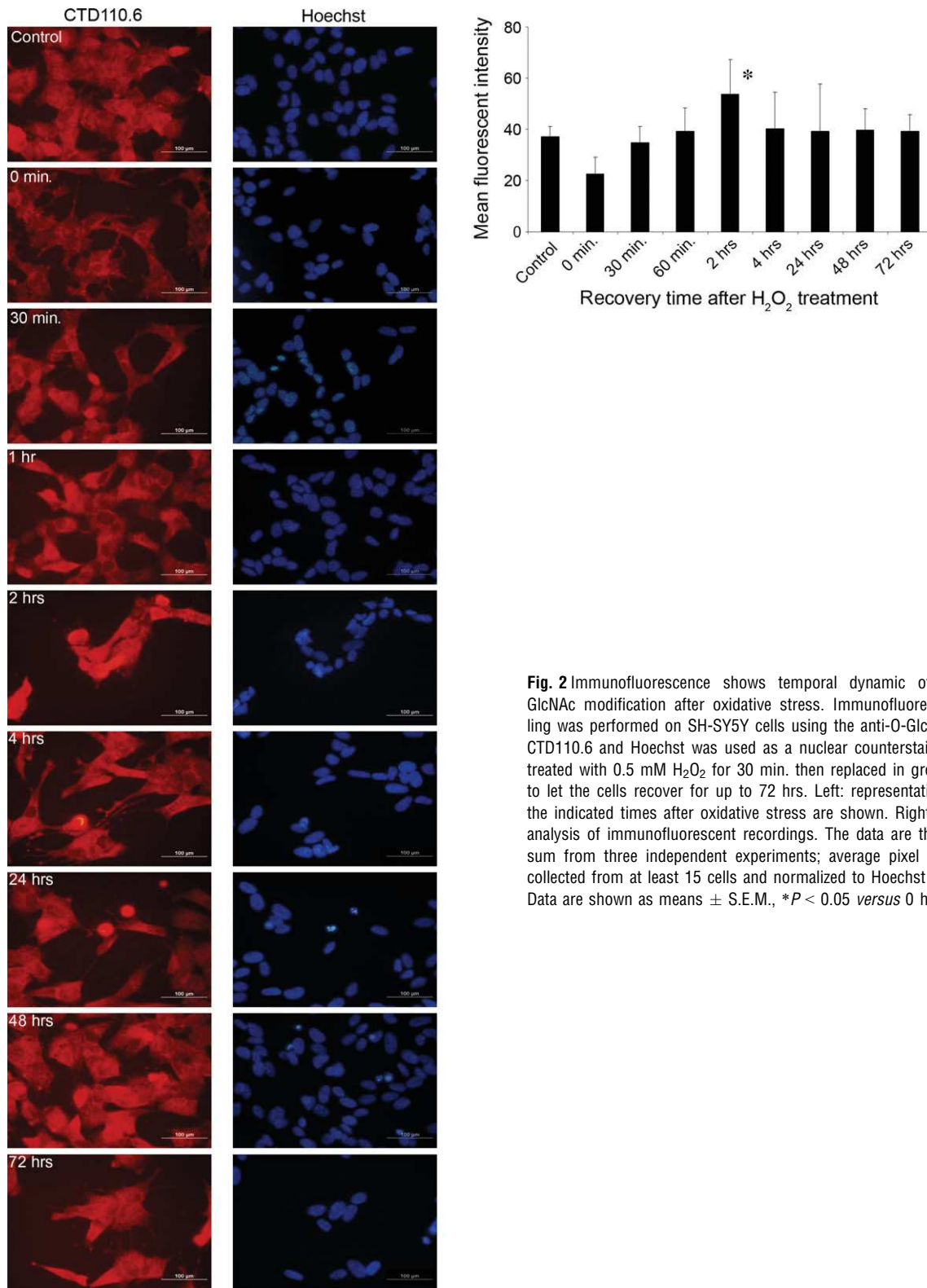


Fig. 2 Immunofluorescence shows temporal dynamic of protein O-GlcNAc modification after oxidative stress. Immunofluorescence labeling was performed on SH-SY5Y cells using the anti-O-GlcNAc antibody CTD110.6 and Hoechst was used as a nuclear counterstain. Cells were treated with 0.5 mM H₂O₂ for 30 min. then replaced in growth medium to let the cells recover for up to 72 hrs. Left: representative images at the indicated times after oxidative stress are shown. Right: quantitative analysis of immunofluorescent recordings. The data are the cumulative sum from three independent experiments; average pixel intensity was collected from at least 15 cells and normalized to Hoechst counterstain. Data are shown as means ± S.E.M., **P* < 0.05 versus 0 hr.

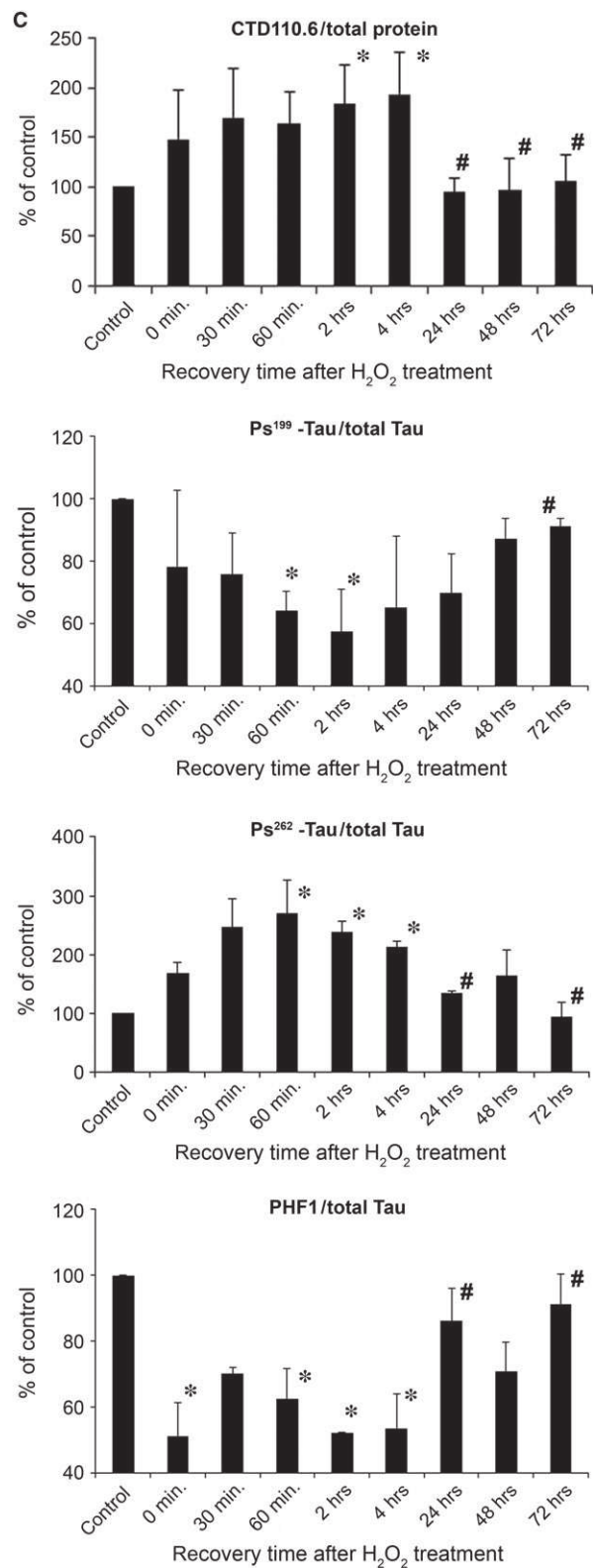
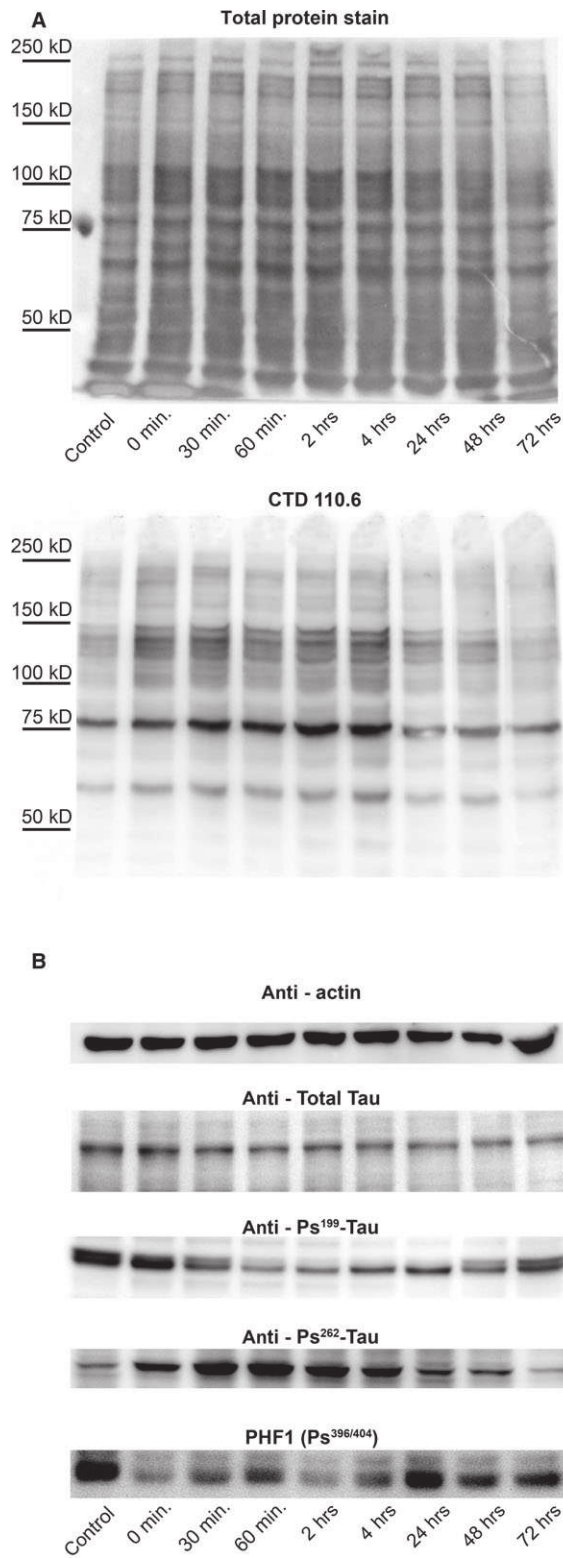


Fig. 3 Temporal dynamics of O-GlcNAc modification and tau phosphorylation after oxidative stress revealed by Western blot. **(A)** Western blot analysis using SYPRO Ruby Blot Total Protein Staining and CTD110.6 antibody and **(B)** actin, total tau, [Ps¹⁹⁹], [Ps²⁶²] and PHF1 staining shows representative samples of protein extracts from SH-SY5Y cells previously incubated for 30 min. with 0.5 mM H₂O₂ then replaced in normal growth medium to recover. **(C)** Densitometric analysis of the CTD110.6 and [Ps¹⁹⁹], [Ps²⁶²] and PHF1 staining over time. Levels are expressed as a percentage of the baseline ratio. Each data point represents the average of at least three separate experiments. Data are shown as means \pm S.E.M., **P* < 0.05 versus Control, #*P* < 0.05 versus 2 hrs.

hexosamine biosynthesis pathway (HBP) also influences O-GlcNAc levels by the regulation of the availability of UDP-GlcNAc. The first, rate-limiting step of HBP is catalysed by GFAT. Therefore, we analysed the mRNA expressional levels of two key enzymes related to O-GlcNAc; GFAT (Fig. 4A) and OGT (Fig. 4B).

SH-SY5Y cells were exposed to the same oxidative stress condition and recovery periods as described above. We found that the mRNA level of both GFAT and OGT showed a biphasic dynamic. First, GFAT and OGT mRNA was increased by up to ~3 \times the normal expressional rate peaking at 4 hrs post-stress, than the expressional levels gradually decreased close to the normal levels in the next 3 days.

Discussion

In this study we demonstrated the effect of 30 min. treatment with 0.5 mM H₂O₂ on the regulation of the O-GlcNAc dynamics in SH-SY5Y neuroblastoma cells. We have found that following this oxidative stress, protein O-GlcNAc modification and mRNA expressional levels of GFAT and OGT, the rate-limiting enzymes of HBP and O-GlcNAc, respectively, are all changing in a very similar manner over time (Figs 3 and 4). O-GlcNAc levels were increased significantly reaching peak values 2–4 hrs post-stress. At a longer time scale – after about 24–72 hrs – the cells apparently recovered from the stress and O-GlcNAc returned to normal levels similar to what was observed prior to stress. Interestingly, we found that tau phosphorylation changed in a reciprocal way; it decreased at 2–4 hrs after stress, but increased again after about 72 hrs following stress. These results suggest that O-GlcNAc modification is a sensitive, dynamic marker of cellular stress and that its interaction with other intracellular processes (such as the Alzheimer's hallmark tau phosphorylation) can have both acute and chronic consequences.

O-GlcNAc seems to regulate (or at the least influence) many intracellular processes such as cell-cycle [24], epigenetics [25], stress adaptation [12], Ca²⁺ signalling [26] or phosphorylation [27], consequently its imbalance has been investigated in the development of many diseases. Since its discovery [28], O-GlcNAc has been implicated either as a beneficial (*e.g.* in Alzheimer's disease [29] and ischemia reperfusion [30]), or as an adverse factor (insulin resistance, diabetes [22] and malignant disorders [31]). Chronic diseases in which O-GlcNAc seems to be involved take years or even decades to develop; however, O-GlcNAc also has relevance in cellular mechanisms that take place at a much shorter time scale. In particular, stress response and the role of O-GlcNAc in cellular adaptation to various stresses such as hypoxia or oxidative stress has been intensively studied [32, 33]. Most of these studies were conducted on

cardiomyocytes and on isolated perfused hearts. Overwhelming number of evidence from these studies suggests two main conclusions; (i) overall O-GlcNAc level tends to increase shortly after stress, (ii) increasing the level of O-GlcNAc seems to protect from the deleterious effect of stress [30, 34–36]. Theories have been put forward to explain the protective effect of O-GlcNAc, such as HSP activation or modulation of Ca²⁺ signalling [32, 37], but the complex pro-survival mechanism of O-GlcNAc remains to be elucidated. In contrast to cardiac tissue, relatively little is known about O-GlcNAc's behaviour during stress in the neuronal tissue. Interestingly, the available literature suggests that O-GlcNAc is rather down-regulated by hypotonic [38], or LPS-induced stress [39]. On the other hand (and paradoxically), Cheung and Hart [40] found that glucose deprivation significantly increased O-GlcNAc levels in Neuro-2a murine neuroblastoma cells. In our present experiments we have found that in SH-SY5Y cell line, which is a human neuroblastoma cell line, O-GlcNAc levels behave in a similar manner as in cardiomyocytes (Fig. 3). Moreover, O-GlcNAc elevation was accompanied by the up-regulation of key regulators of the HBP pathway, to support the cells' need for more O-GlcNAc (Fig. 4). Thus, our data demonstrate that O-GlcNAc increases upon oxidative stress are an actively regulated process in neuronal cells.

Contrary to the relatively unexplored behaviour of O-GlcNAc during acute stress response in neuronal cells, its reciprocal relationship with phosphorylation and imbalance in Alzheimer's disease is well-established [19, 22]. According to the generally accepted view, the dynamic balance between phosphorylation and O-GlcNAc modification on tau proteins in Alzheimer's patients is shifted in favour of the phosphorylation which will result in hyperphosphorylated tau and neurofibrillary tangle deposition. Stress, and especially oxidative stress is also strongly implicated in the pathophysiology of Alzheimer's disease, however, the exact relationship between oxidative stress and tau phosphorylation is controversial. Some of the oxidative agents cause hyperphosphorylation, whereas others induce de-phosphorylation of tau [41]. Multiple studies also indicated that tau hyperphosphorylation can follow, but also precede oxidative stress [42]. To our knowledge, O-GlcNAc modification of tau has not been investigated in oxidative stress before, however, common sense dictates that the reciprocal relationship between phosphorylation and O-GlcNAc should be maintained also under this condition. In our experiments, we have found that 30 min. long oxidative stress by H₂O₂ resulted in temporal decrease of tau phosphorylation at site S199 and PHF1, but reciprocal elevation in O-GlcNAc modified proteins (Fig. 3). Interestingly, the phosphorylation at site S262 showed similar dynamic pattern as O-GlcNAc levels. Although the interplay between O-GlcNAc and phosphorylation is usually characterized by same site competition, other mechanism such as proximal site

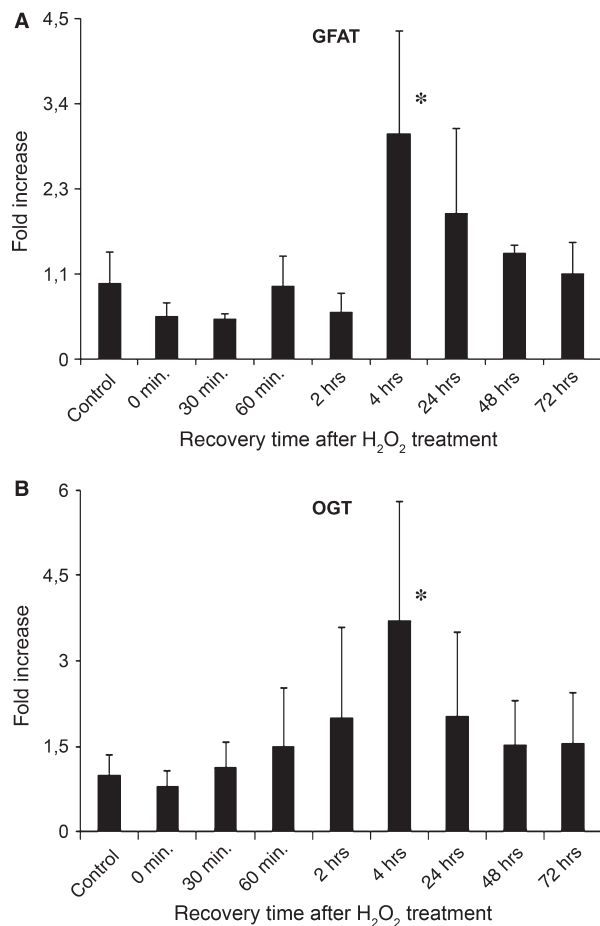


Fig. 4 Temporal dynamics of OGT and GFAT expression after oxidative stress follow similar pattern as protein O-GlcNAc modification. SH-SY5Y cells were treated with 0.5 mM H₂O₂ for 30 min. in serum-free growth medium, then the medium was replaced and cells were incubated under normal growth conditions until harvesting the cells. Each bar represents fold increase in relative levels of OGT or GFAT mRNA compared with control samples. **(A)** Relative levels of GFAT mRNA in cells exposed to oxidative stress at the indicated post-stress times. **(B)** Relative levels of OGT mRNA in cells exposed to oxidative stress at the indicated post-stress times. Data are means \pm S.E.M. from at least three independent experiments. * $P < 0.05$ versus control cells.

competition or proximal site occupation is also known [13]. Increased phosphorylation at S262 (and possibly at other sites as well) after oxidative stress despite elevated level of O-GlcNAc could be the result

References

1. Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in health and disease. *J Cell Mol Med.* 2007; 11: 1214–24.
2. Kültz D. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J Exp Biol.* 2003; 206: 3119–24.
3. Kültz D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol.* 2005; 67: 225–57.

that either O-GlcNAc is not competing or even contributing to phosphorylation under various conditions.

Although our O-GlcNAc data collected from SH-SY5Y neuroblastoma exposed to H₂O₂ induced oxidative stress are in accordance with the data found in cardiomyocytes and also demonstrate the reciprocal relationship between O-GlcNAc and specific tau phosphorylation sites, the question whether these effects observed at short term could be understood and interpreted also under chronic conditions remains to be answered. In Alzheimer's disease, despite oxidative stress is a major factor in the pathophysiology, the dynamic of O-GlcNAc seems to be reversed. It is also important to note that diabetes is a risk factor for Alzheimer's disease [43]. One of the mechanism by which diabetes could accelerate the development of AD is increased ROS production. Insulin resistance in type 2 diabetes was also found to be associated with AD. How big of a role O-GlcNAc plays in these processes and how these processes are related to the regulation of tau phosphorylation still needs to be addressed. Nevertheless, we think that studying O-GlcNAc modification simultaneously with tau phosphorylation in oxidative stress-exposed neuronal cells should significantly contribute to the understanding of the development of Alzheimer's disease.

A number of studies deal with the role of O-GlcNAc in various stress situations [12, 13, 32, 33]. Here, we demonstrated, for the first time, that treatment with 0.5 mM H₂O₂ for 30 min. to induce oxidative stress causes a rapid, temporary increase in O-GlcNAc in SH-SY5Y neuroblastoma cells. We have also shown that the dynamic changes in protein O-GlcNAc modification can behave in an inverse relationship with tau phosphorylation during recovery from oxidative stress. Taken together, we think that O-GlcNAc regulation is an important mechanism in stress adaptation and it is conceivable that protein O-GlcNAc modification is part of a complex system that influences not only short-term effects but also chronic pathophysiologic events such as Alzheimer's disease.

Acknowledgements

This work was funded by the Research Fund of the University of Pécs, Faculty of Medicine (ÁOK-KA 2013/19) and supported by János Szentágothai Research Centre, University of Pécs. We thank Professor Dr. Peter Davies at the Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY for providing the PHF1 antibody. EK, JP, SVP and RP performed the research; TN and AM designed the research study; JP contributed essential reagents or tools; EK and TN analysed the data; AM and TN wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

4. **Green DR, Galluzzi L, Kroemer G.** Metabolic control of cell death. *Science*. 2014; 345: 1250256.
5. **de Nadal E, Ammerer G, Posas F.** Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet*. 2011; 12: 833–45.
6. **Fulda S, Gorman AM, Hori O, et al.** Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*. 2010; 2010: 214074.
7. **Wu Y-T, Wu S-B, Wei Y-H.** Metabolic reprogramming of human cells in response to oxidative stress: implications in the pathophysiology and therapy of mitochondrial diseases. *Curr Pharm Des*. 2014; 20: 5510–26.
8. **Walter P, Ron D.** The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011; 334: 1081–6.
9. **Utz PJ, Anderson P.** Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ*. 2000; 7: 589–602.
10. **Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M.** Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011; 475: 324–32.
11. **Storey KB, Wu C-W.** Stress response and adaptation: a new molecular toolkit for the 21st century. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2013; 165: 417–28.
12. **Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, et al.** Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress: A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem*. 2004; 279: 30133–42.
13. **Butkinaree C, Park K, Hart GW.** O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800: 96–106.
14. **Hart GW, Housley MP, Slawson C.** Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*. 2007; 446: 1017–22.
15. **Zachara NE, Hart GW.** Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc!. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2006; 1761: 599–617.
16. **Hahne H, Sobotzki N, Nyberg T, et al.** Proteome wide purification and identification of O-GlcNAc-modified proteins using click chemistry and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2013; 12: 927–36.
17. **Fülöp N, Marchase RB, Chatham JC.** Role of protein O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2007; 73: 288–97.
18. **Rexach JE, Clark PM, Hsieh-Wilson LC.** Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain. *Nat Chem Biol*. 2008; 4: 97–106.
19. **Deng Y, Li B, Liu F, et al.** Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *FASEB J*. 2008; 22: 138–45.
20. **Castino R, Fiorentino I, Cagnin M, et al.** Chelation of lysosomal iron protects dopaminergic SH-SY5Y neuroblastoma cells from hydrogen peroxide toxicity by precluding autophagy and Akt dephosphorylation. *Toxicol Sci*. 2011; 123: 523–41.
21. **Chetsawang J, Govitrapong P, Chetsawang B.** Hydrogen peroxide toxicity induces Ras signaling in human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010: 3–7.
22. **Dias WB, Hart GW.** O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst*. 2007; 3: 766–72.
23. **Zhu Y, Shan X, Yuzwa SA, et al.** The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2014; 289: 34472–81.
24. **Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, et al.** Perturbations in O-linked β -N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem*. 2005; 280: 32944–56.
25. **Fujiki R, Chikanishi T, Hashiba W, et al.** GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature*. 2009; 459: 455–9.
26. **Nagy T, Champattanachai V, Marchase RB, et al.** Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca^{2+} elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 290: C57–65.
27. **Wang Z, Pandey A, Hart GW.** Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6: 1365–79.
28. **Torres CR, Hart GW.** Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. 1984; 259: 3308–17.
29. **Graham DL, Gray AJ, Joyce JA, et al.** Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology*. 2014; 79: 307–13.
30. **Ngoh GA, Hamid T, Prabhu SD, et al.** O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H1711–9.
31. **Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, et al.** O-GlcNAcylation: A new cancer hallmark? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4: 99.
32. **Chatham JC, Marchase RB.** The role of protein O-linked Beta-N-acetylglucosamine in mediating cardiac stress responses. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800: 57–66.
33. **Ngoh GA, Watson LJ, Facundo HT, et al.** Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids*. 2011; 40: 895–911.
34. **Vibjerg Jensen R, Johnsen J, Buus Kristiansen S, et al.** Ischemic preconditioning increases myocardial O-GlcNAc glycosylation. *Scand Cardiovasc J*. 2013; 47: 168–74.
35. **Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC.** Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 294: C1509–20.
36. **Liu J, Pang Y, Chang T, et al.** Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 40: 303–12.
37. **Nagy T, Miseta A, Kovacs L.** Protein-associated O-GlcNAc, a multifunctional mechanism in cell signaling and its role in the pathogenesis of diabetes, stress and malignant diseases. *Biochem Medica*. 2007; 17: 162–77.
38. **Kommaddi RP, Dickson KM, Barker PA.** Stress-induced expression of the p75 neurotrophin receptor is regulated by O-GlcNAcylation of the Sp1 transcription factor. *J Neurochem*. 2011; 116: 396–405.
39. **Zheng GM, Yu C, Yang Z.** Puerarin suppresses production of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced M9 microglial cells through regulating MAPK phosphorylation, O-GlcNAcylation and NF- κ B translocation. *Int J Oncol*. 2012; 40: 1610–8.
40. **Cheung WD, Hart GW.** AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J Biol Chem*. 2008; 283: 13009–20.
41. **Su B, Wang X, Lee H-G, et al.** Chronic oxidative stress causes increased tau phosphorylation in M17 neuroblastoma cells. *Neurosci Lett*. 2010; 468: 267–71.
42. **Luque-Contreras D, Carvajal K, Toral-Rios D, et al.** Oxidative stress and metabolic syndrome: cause or consequence of Alzheimer's disease? *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 1–11.
43. **Verdile G, Fuller SJ, Martins RN.** The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 2015; 84: 22–38.



Protein O-GlcNAc Modification Increases in White Blood Cells After a Single Bout of Physical Exercise

Tamás Nagy^{1,2*}, Emese Kátai¹, Viktória Fisi¹, Tamás Tibor Takács¹, Antal Stréda³, István Wittmann³ and Attila Miseta¹

¹Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ²János Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary, ³Department of Internal Medicine and Nephrology Center, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

OPEN ACCESS

Edited by:

Fulvio D'Acquisto,
University of Roehampton,
United Kingdom

Reviewed by:

Toshiyuki Murai,
Osaka University,
Japan
Nandor Gabor Than,
Hungarian Academy of
Sciences (MTA),
Hungary

*Correspondence:

Tamás Nagy
nagy.tamas@pte.hu

Specialty section:

This article was submitted
to Inflammation, a
section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 21 February 2018

Accepted: 18 April 2018

Published: 03 May 2018

Citation:

Nagy T, Kátai E, Fisi V,
Takács TT, Stréda A, Wittmann I
and Miseta A (2018) Protein
O-GlcNAc Modification Increases
in White Blood Cells After a Single
Bout of Physical Exercise.
Front. Immunol. 9:970.
doi: 10.3389/fimmu.2018.00970

Background: Protein O-linked *N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a dynamic posttranslational modification influencing the function of many intracellular proteins. Recently it was revealed that O-GlcNAc regulation is modified under various stress states, including ischemia and oxidative stress. Aside from a few contradictory studies based on animal models, the effect of exercise on O-GlcNAc is unexplored.

Purpose: To evaluate O-GlcNAc levels in white blood cells (WBC) of human volunteers following physical exercise.

Methods: Young (age 30 ± 5.2), healthy male volunteers ($n = 6$) were enlisted for the study. Blood parameters including metabolites, ions, “necro”-enzymes, and cell counts were measured before and after a single bout of exercise (2-mile run). From WBC samples, we performed western blots to detect O-GlcNAc modified proteins. The distribution of O-GlcNAc in WBC subpopulations was assessed by flow cytometry.

Results: Elevation of serum lactic acid (increased from 1.3 ± 0.4 to 6.9 ± 1.7 mM), creatinine (from 77.5 ± 6.3 U/L to 102.2 ± 7.0 μ M), and lactate dehydrogenase (from 318.5 ± 26.2 to 380.5 ± 33.2 U/L) confirmed the effect of exercise. WBC count also significantly increased (from 6.6 ± 1.0 to 8.4 ± 1.4 G/L). The level of O-GlcNAc modified proteins in WBCs showed significant elevation after exercise ($85 \pm 51\%$, $p < 0.05$). Flow cytometry revealed that most of this change could be attributed to lymphocytes and monocytes.

Conclusion: Our results indicate that short-term exercise impacts the O-GlcNAc status of WBCs. O-GlcNAc modification could be a natural process by which physical activity modulates the immune system. Further research could elucidate the role of O-GlcNAc during exercise and validate O-GlcNAc as a biomarker for fitness assessment.

Keywords: exercise, O-GlcNAc, stress response, white blood cells, exercise immunology

INTRODUCTION

Physical exercise is generally acknowledged as a beneficial activity and widely promoted to increase physical fitness, the quality of life, and life expectancy (1–4). In fact, exercise (especially regular exercise) not exceeding our actual tolerance level is a way to precondition and protect our body from future harmful events (5, 6). During physical exercise, the cells in our body have to adapt to

a significantly more challenging condition than during regular, resting state. Mechanical workload and strain increases in the musculoskeletal system, hemodynamic shear stress is intensified on vascular and circulating cells, largely enhanced metabolism in the muscles generates free radicals and acidosis while other tissues' metabolism has to temporarily decline (7–11). Overall, exercise is a type of stress and the cells has to adapt to it by various stress response mechanisms (5, 12). The underlying molecular events of the stress response elicited are numerous, including regulation of mitochondrial activity, increased expression of heat-shock proteins, and elements of the free radical scavenge system (13–16). Although intensively studied, the understanding of how these processes are activated is still not complete.

In recent years, protein O-linked *N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification emerged as a possible signaling mechanism that could mediate the effects of intracellular metabolic and stress response (17). O-GlcNAc is a dynamic and reversible posttranslational sugar modification on serine and threonine residues of intracellular proteins by attachment or removal of a single *N*-acetylglucosamine molecule. O-GlcNAc modification is similar to phosphorylation; indeed, it may compete for the same Ser/Thr sites with phosphorylation, although other types of interplays, such as proximal site competition and proximal site occupation were also proposed (18). As detection methods improve, the number of proteins known to be O-GlcNAc modified grows significantly; around 1,500 proteins were identified to be influenced by O-GlcNAc (19, 20), including signaling components, transcriptional factors, and metabolic enzymes. An important feature of O-GlcNAc modification is that it closely connected to carbohydrate metabolism. The substrate for O-GlcNAc modification is uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), the end product of the hexosamine biosynthesis pathway which depends on the availability of glucose in the cells. On the other hand, O-GlcNAc was found to act as a nutrient sensor, regulating the glucose uptake and insulin resistance of the cells (21). Interestingly, Zachara et al. showed in their 2004 paper that stress also induced an increase of O-GlcNAc modification (22). Since then, many study demonstrated that O-GlcNAc is sensitive for a variety of stressors, including hypoxia and oxidative stress. Moreover, accumulating data—mostly collected in studies using cardiomyocytes or cardiac animal models—suggest that elevated O-GlcNAc has a protective role in hypoxia and/or oxidative stress related injuries (23).

O-GlcNAc has been also proposed as a mediator element in preconditioning experiments, e.g., Vibjerg Jensen et al. found that two 5 min long no-flow ischemia in isolated perfused rat hearts elevated O-GlcNAc levels and argue that this process might contribute to the cardioprotection (24). Jones et al. had similar results and also concluded that O-GlcNAc may protect by modifying mitochondrial proteins such as voltage-dependent anion channels (25). The effect of physical exercise on O-GlcNAc levels were studied in only a limited number of animal models, with controversial results. Long-term (regular exercise) effects were found to either increase or decrease O-GlcNAc levels in rodent cardiac and muscle tissues (26–29). There are only two studies available that analyzed the effect of acute exercise on protein O-GlcNAc modification. Peternej et al. showed increased

O-GlcNAc levels in rat skeletal muscle following acute exercise (running until exhaustion) (30). By contrast, Medford et al. found that O-GlcNAc levels decreased after 15 min but did not change significantly after 30 min of treadmill running in mice hearts (31). Although no study was conducted, yet on blood samples following acute exercise, analysis of leukocytes and leukocyte-derived cell lines suggest that leukocytes can and will respond with altered O-GlcNAc levels to activation and to metabolic challenges (32–35). Moreover, it was also suggested that changing O-GlcNAc levels may have immunomodulatory effects (36). Since the immune system is deeply involved in our body's response to physical exercise, it would be of significant value to clarify the possible role of O-GlcNAc in exercised induced limited inflammatory response (37).

In our present study, we hypothesized that physical exercise would elicit a limited stress response of the body that would include altered O-GlcNAc protein modification and that this process would manifest at least in some elements of the cellular immunity. Thus, our aim was to investigate whether O-GlcNAc levels are influenced by a single bout of physical exercise in isolated white blood cells (WBC) of healthy, male humans. Our data reveal that O-GlcNAc modification is a dynamic intracellular process in leukocytes. We also show that subpopulations of leukocytes may have different responses to acute exercise, concerning their O-GlcNAc levels.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and Experimental Design

Six male volunteers were recruited for this pilot study, the age of the volunteers ranged from 24 to 39 years. All subjects were informed about the procedures and the risks of the experiments before obtaining written informed consents. All procedures were approved by the Regional Committee for Research Ethics of the University of Pécs, Hungary (approval No.: 5187). The selection criteria for the participants included no obesity, no smoking, no regular medications taken, and no known acute or chronic disease present (**Table 1**). The experimental setup was designed to contain two (almost identical) phases: (1) resting and (2) exercise. The two phases were separated by a 3-week period. In each phases, the participants were asked to report at the laboratory in the morning after 12 h of fasting and 48 h of restrain from any strenuous physical exercise. Venous blood was drawn from the cubital veins during both phases (before resting and before exercise samples).

TABLE 1 | Characteristics of the study subjects.

Variable	<i>n</i> = 6
Age (years)	30 ± 5.2
Body weight (kg)	77 ± 8.6
BMI (kg/m ²)	23.94 ± 2.3
History of smoking	0 (0%)
Chronic diseases	0 (0%)
Regular medications	0 (0%)
2-Mile run (duration)	940 ± 85 s
Regular exercise/week (duration)	119 ± 88 min

Data are mean ± SD.

Next, the volunteers received identical breakfasts (~600 kcal, 80% carbohydrate). In the first phase, the volunteers were asked after breakfast to restrain from any physical activity for 3.5 h before collecting the second set of blood samples (after resting samples). In the second phase, the volunteers were asked 3 h after breakfast to complete a 2-mile running exercise which was followed by the final blood sample collection (after exercise samples). The 2-mile running exercise were carried out and assessed according to the instructions of the US Army physical fitness test (38). Briefly, the participants were asked to complete the 2-mile course in the shortest time possible, without stopping or any physical help.

Blood Sampling

Venous blood samples were collected in suitable vacutainers; tubes containing potassium ethylenediaminetetra-acetic acid (K-EDTA) were used for testing cellular blood parameters and to isolate WBCs. Tubes containing sodium-fluoride (NaF) as glycolysis inhibitor were used for plasma glucose and lactate analysis, while tubes without additives were used to obtain serum for the routine laboratory blood tests (Table 2.). After blood collection, plasma and serum were separated by centrifugation (10 min, room

temperature, 1,500 rcf). Blood cell parameters were quantified in a multi-parameter automatic hematology analyzer Cell-Dyn 3700 system (Abbott Diagnostics, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Plasma and serum parameters were measured by Cobas 8000 Modular Analyzer (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions.

Western Blot Analysis

Approximately 2.5 mL of K-EDTA anti-coagulated whole blood was used to isolate mononuclear cells. The anti-coagulated blood samples were layered on Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Cat. No.: 10771) solution and prepared by isopycnic centrifugation (20 min, RT, 500 rcf) immediately after collection. Mononuclear cells were collected from the plasma/1077 interface and washed 2× in ice-cold PBS. Next, the cells were lysed in a modified RIPA buffer [10 mM Tris pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 0.1% SDS, 1% Triton-X 100, 0.5% deoxycholate, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail: 1 tablet/10 mL (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)], kept on ice for 30 min and centrifuged for 10 min at 4°C at 14,000 rcf.

TABLE 2 | Serum biochemical and blood cell parameters before and after exercise or resting.

	Resting		Exercise		Units
	Before	After	Before	After	
Sodium	140.7 ± 1.1	140.2 ± 1.1	141.4 ± 1.2	142.0 ± 1.3	mM
Potassium	4.3 ± 0.3	4.6 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.2 ± 0.2	mM
Calcium	2.4 ± 0.0	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.1 [†]	mM
Magnesium	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	mM
Chloride	97.8 ± 1.6	98.2 ± 1.3	101.6 ± 2.8*	99.8 ± 2.7	mM
Phosphate	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.3 ^{*,#}	mM
Insulin	40.0 ± 8.0	59.5 ± 9.3*	54.0 ± 29.6	51.9 ± 38.9	pM
Lactate	1.4 ± 0.5	1.4 ± 0.4	1.3 ± 0.4	6.9 ± 1.7 ^{*,#}	mM
Glucose	5.2 ± 0.3	4.8 ± 0.7	5.1 ± 0.4	6.4 ± 1.6	mM
Bilirubin	13.7 ± 6.7	13.5 ± 7.2	14.8 ± 7.8	13.7 ± 7.8	μM
Urea	5.6 ± 1.6	5.2 ± 1.4	5.4 ± 1.3	5.2 ± 1.1	mM
Creatinine	86.5 ± 9.6	78.2 ± 9.3*	77.5 ± 6.3	102.2 ± 7.0 ^{*,#}	μM
Uric acid	319.7 ± 53.5	302.7 ± 59.6	314.2 ± 40.8	355.0 ± 47.4	μM
Cholesterol	4.7 ± 0.7	4.9 ± 0.7	4.7 ± 0.7	4.8 ± 0.7	mM
Triglyceride	1.2 ± 0.4	1.9 ± 0.4*	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.5	mM
Lactate dehydrogenase	318.0 ± 32.9	336.5 ± 56.9	318.5 ± 26.2	380.5 ± 33.2 [†]	U/L
Alkaline phosphatase	63.2 ± 10.6	67.0 ± 11.7	74.1 ± 15.4	77.0 ± 13.0	U/L
CK	179.3 ± 81.0	183.8 ± 75.1	196.5 ± 82.3	229.8 ± 90.6	U/L
Total protein	74.0 ± 2.2	76.3 ± 2.6	75.7 ± 4.0	78.0 ± 2.7	g/L
Albumin	48.8 ± 2.0	51.0 ± 1.9*	49.4 ± 2.9	51.9 ± 2.3 [†]	g/L
CRP	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.3	mg/L
White blood cells	6.3 ± 0.8	6.4 ± 1.1	6.6 ± 1.0	8.4 ± 1.4 ^{*,#}	G/L
Neutrophils	3.0 ± 0.7	3.3 ± 1.0	3.2 ± 0.8	3.9 ± 0.9	G/L
Lymphocytes	2.3 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.5 ± 0.3	3.6 ± 0.7 ^{*,#}	G/L
Monocytes	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	G/L
Eosinophils	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.3	G/L
Basophils	<0.1 ± 0.0	<0.1 ± 0.0	<0.1 ± 0.0	<0.1 ± 0.0	G/L
RBC	5.4 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.2 ± 0.3	5.3 ± 0.3	T/L
Hgb	154.3 ± 7.4	155.5 ± 10.7	152.0 ± 9.4	155.9 ± 9.2	g/L
Hct	47.1 ± 2.0	46.9 ± 2.7	46.9 ± 2.6	46.3 ± 2.2	%
PLT	220.8 ± 17.5	236.8 ± 24.1	233.2 ± 19.3	273.7 ± 30.5 ^{*,#}	G/L

Data are mean ± SD (n = 6).

*p < 0.05 vs resting-before.

[†]p < 0.05 vs resting-after.

[#]p < 0.05 vs exercise-before.

From the supernatant, the total protein concentration was determined using Bio-Rad Dc Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were separated on 8% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Blots were probed with the anti-O-GlcNAc antibody RL-2 (1:1,000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat. No.: MA1-072) in 5% non-fat dry milk blocking buffer and followed by HRP conjugated goat anti-mouse IgG (1:5,000; Thermo Fisher Scientific). For loading control, anti-actin IgG antibody (1:1,500, Sigma-Aldrich, Cat. No.: A2103) was used. The blots were developed using Femto chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific) and the signal was detected by G:BOX Chemi HR1.4 gel imaging system (Syngene, Cambridge, UK). Densitometry was quantified by calculating average pixel intensities of whole lanes followed by background subtraction using ImageJ analysis software. The O-GlcNAc levels of the samples were normalized for protein content by anti-actin staining.

Flow Cytometry

Immediately after collection, whole blood samples were treated using Lyse/Fix Buffer (BD Biosciences, Cat. No.: 558049), which simultaneously lysed red blood cells and fixed WBC, according to the manufacturer's instructions. After discarding the supernatant containing the hemolyzed red blood cells, fixed WBCs were washed once in PBS, and permeabilized with 0.5% Triton X-100-PBS for 2 min. Next, non-specific binding sites were blocked by 5% BSA-PBS for 5 min, and then the cells were incubated with a 1:200 dilution of the anti-O-GlcNAc antibody RL2 in 5% BSA-PBS for 30 min at 37°C. After being rinsed in PBS, the cells were incubated with a 1:200 dilution of secondary antibody fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific) in 5% BSA-PBS for 30 min at 37°C. Finally, the cells were washed once and then resuspended in PBS before analysis. Forward, side scatter values and fluorescence intensities [detected at 525 nm (FL1 channel)] per cells were measured with a Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Defining the regions of various WBC subpopulations and quantification of data were performed by using FlowJo analysis software.

Data Analysis

Data are presented as means \pm SDs throughout. Comparisons were performed using Student's *t*-test and statistically significant differences between groups were defined as *p* values <0.05 and are indicated in the legends to the figures. When mentioned, not significant values were indicated as not significant (NS). For serum biochemical and blood cell parameters, two-way repeated measures ANOVA was used to evaluate changes. When significant changes were identified, pairwise comparison with Bonferroni's correction was used. The type I error rate (α) was set to 0.05.

RESULTS

Clinical Characteristic of the Subjects

In this pilot study, six male volunteers participated, their mean age was 30 years (Table 1). All of the participants were considered healthy, with no history of chronic diseases. Smoking or

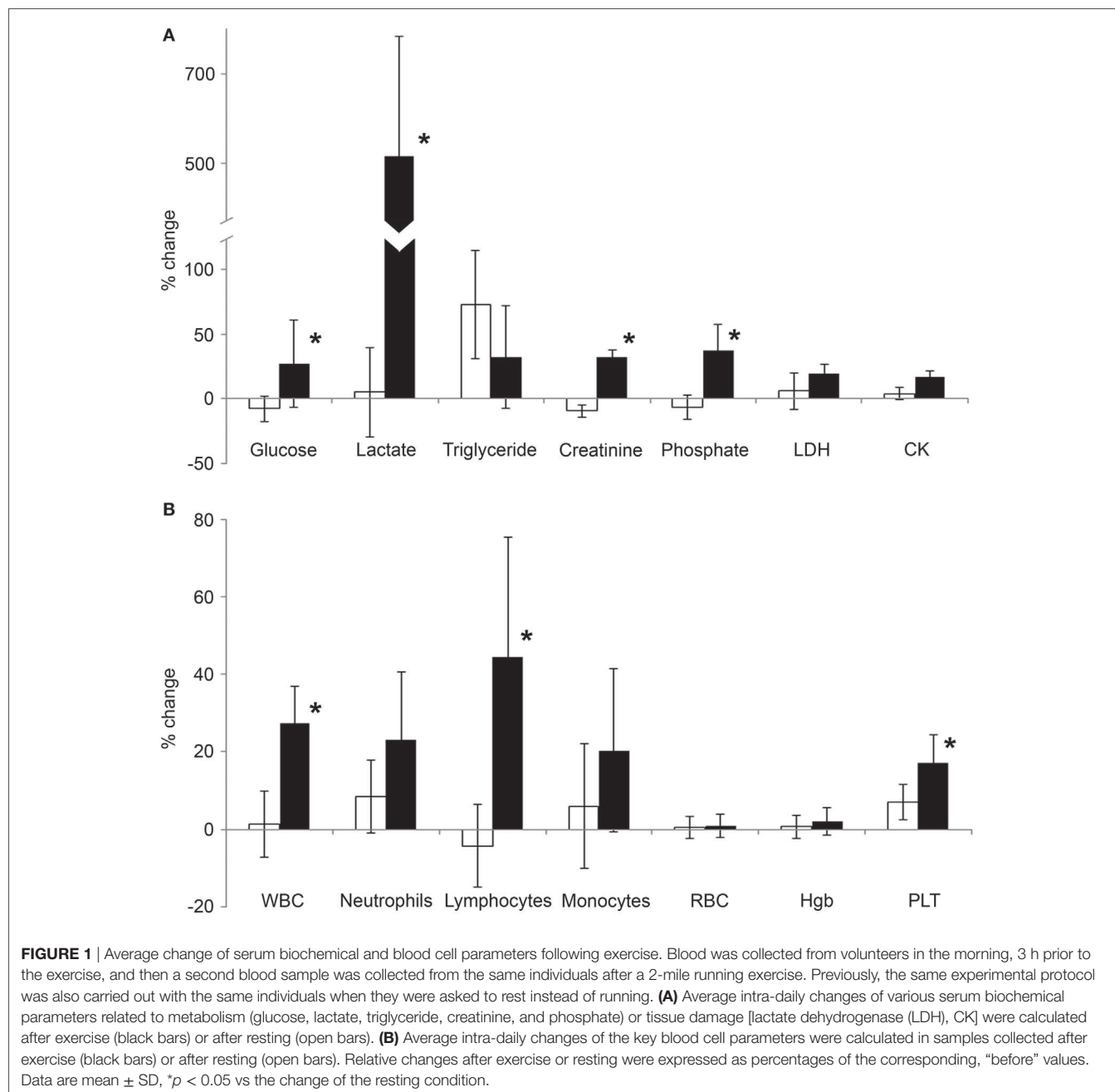
taking medication regularly was not reported. None of the volunteers were obese, and only two of them exceeded the 25 kg/m² BMI mark (26.03 and 27.76). All participants claimed to regularly perform moderate to high intensity exercises, with a minimum duration of 30 min/week. The volunteers performed above the required minimum of their corresponding age group in the 2-mile running exercise, the duration of the exercise ranged from 12:53 to 17:24 min (Table 1).

A series of biochemical parameters were analyzed from the blood, including ions, metabolic parameters, tissue damage, and inflammatory markers, and cellular parameters. We found that all parameters were within the normal range when measured from the early morning (before resting and before exercise) samples (Table 2). There was no significant difference in any of the measured parameters when the first samples of the two phases were compared (before resting vs before exercise). In the first phase, when the volunteers were asked to restrain from any physical activity, a few parameters changed significantly in the second (after resting) blood samples: insulin, triglyceride, albumin, and creatinine. These changes albeit statistically significant, could be attributed to diurnal variations (albumin and creatinine) or to the metabolic, post-prandial effect of the standardized breakfast (insulin and triglyceride). However, many of the blood parameters changed following exercise: phosphate, lactate, creatinine, lactate dehydrogenase (LDH), albumin, WBC, lymphocyte, and platelet counts significantly increased when compared to their corresponding parameters measured before exercise. To exclude the influence caused by either diurnal variations or post-prandial effects, we also compared the intra-daily changes in the resting phase with the intra-daily changes in the exercise phase (Figure 1). We have found that exercise compared to resting had a significantly different impact on glucose (average intra-daily change: 27.2 vs -7.9%), lactate (515 vs 5%), creatinine (32 vs -9.6%), phosphate (37.5 vs -6.3%), WBC (27.6 vs 1.3%), lymphocyte (44.5 vs -4.4%), and platelets (17.3 vs 7.1%) values.

Flow Cytometry Shows Elevated O-GlcNAc in Lymphocytes and Monocytes

To assess the effect of physical exercise on WBCs, EDTA anti-coagulated blood was collected before and after exercise carrying out the same experimental conditions as described above. Isolated and fixed blood cells were fluorescently labeled for O-GlcNAc with RL2 anti-O-GlcNAc antibody. Figure 2 shows that based on the forward scatter and side scatter values [generally accepted to report cell size and granularity (39)], three distinct group of cells could be clearly identified; granulocytes, monocytes, and lymphocytes. Restricting the selection of the cells to the regions highlighted in Figure 2A, O-GlcNAc levels (FL1 fluorescence) of the three cell types were analyzed separately. We found that granulocytes had approximately the same O-GlcNAc levels before and after exercise (relative fluorescence: 1.0 ± 0.1 vs 1.1 ± 0.16 , NS), while lymphocytes (relative fluorescence: 3.1 ± 0.26 vs 3.8 ± 0.34 , $p < 0.05$) and monocytes (relative fluorescence: 4.2 ± 0.25 vs 5.3 ± 0.48 , $p < 0.05$) showed a significant right shift (i.e., increased level of O-GlcNAc) after physical exercise (Figures 2B,C).

Elevation of O-GlcNAc levels in a population of cells could be either the result of an overall increase in every cell, or a larger



increase in a subpopulation of the cells. In our study, lymphocyte count increased following exercise (2.3 ± 0.5 vs 3.2 ± 0.8 G/L, $p < 0.05$, **Table 2**), suggesting that a new subset of cells carrying more O-GlcNAc might have entered the circulation (40). The distribution of cells in the FL1 histogram could resolve whether O-GlcNAc elevation is due to an elevation of O-GlcNAc across all lymphocytes or due to the appearance of a new, above than average O-GlcNAcylated subset of cells. Our experiments support the former case; we found that lymphocytes showed near Gaussian distribution both before and after exercise (**Figure 2B**). Although the analysis of monocyte distribution is much less reliable due to their lower proportion (0.4 ± 0.1 G/L before and 0.5 ± 0.1 G/L

after exercise, NS), monocytes appeared to have at least two types of subpopulation when O-GlcNAc levels were analyzed. Since we found no significant change in monocyte count after exercise, it is possible that a subset of monocytes is more sensitive to exercise than the rest.

Elevation of O-GlcNAc in Mononuclear Cells After Exercise Confirmed by Western Blot

Blood samples were collected parallel with the samples used for testing the biochemical parameters; before/after resting and

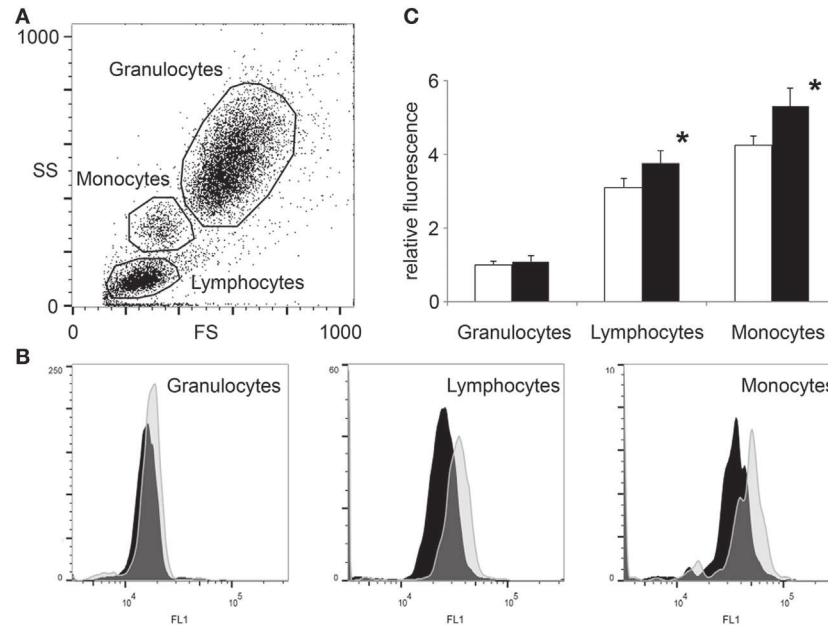


FIGURE 2 | Flow cytometry shows increased O-GlcNAc levels in lymphocytes and monocytes but not in granulocytes after exercise. White blood cells were isolated from blood collected 3 h before and after a 2-mile running exercise. After labeling with anti-O-GlcNAc antibody RL2 and green fluorescent secondary antibody (detected at FL1 channel), the cells were counted by flow cytometry. **(A)** Data points are shown as a function of forward scatter and side scatter (FS—x-axis, SS—y-axis). Three major group of cells were selected; granulocytes, lymphocytes, and monocytes. **(B)** The O-GlcNAc staining (FL1 channel) of the three regions of cells were individually displayed by histograms. Distribution of cells collected before exercise are presented by black histograms, while the distribution of cells collected after exercise are presented by light gray histograms. **(C)** Relative FL1 fluorescence levels of O-GlcNAc labeled blood cells, collected before (open bars) and after (black bars) exercise. The mean fluorescence level of the granulocytes collected before exercise was selected for baseline. Data are shown as mean \pm SD, * $p < 0.05$ vs before exercise.

exercise. Mononuclear cells were isolated from EDTA anti-coagulated blood by Histopaque-1077 separation immediately after blood collection. **Figure 3** shows the level of O-GlcNAc proteins of three volunteers, before and after physical exercise or resting. The resulting banding patterns were similar to those published in previous reports (41, 42). As expected, we have found no significant changes in O-GlcNAc levels when the volunteers were asked to rest between blood collections. However, an approximately 15 min of intensive running caused a significant increase in intensity of overall O-GlcNAc staining ($85 \pm 51\%$ increase, $p < 0.05$) when compared to the samples collected before exercise ($16 \pm 9\%$ increase, NS).

To demonstrate the specificity of the O-GlcNAc antibody, a duplicate immunoblot was prepared by co-incubating RL2 antibody with 20 mM *N*-acetylglucosamine. As shown in **Figure 4**, *N*-acetylglucosamine decreased the western blot signal by about five times, compared to the uninhibited samples ($19 \pm 2\%$ of control).

DISCUSSION

In the present study, we have analyzed the effect of a 2-mile running exercise on the level of O-GlcNAc modification in leukocytes collected from human volunteers. We have found that overall level of O-GlcNAc modified proteins significantly increased following exercise when compared to control, resting

experimental conditions. We have also found that lymphocytes and—to a lesser extent—monocytes were mostly responsible for this increase while the O-GlcNAc levels of granulocytes remained relatively unchanged. Our data also suggest that the elevation of O-GlcNAc is a general event rather than a redistribution of certain lymphocyte subpopulations (carrying various amount of O-GlcNAc modification) in the circulation.

Our study was designed to focus on a single bout of physical challenge and to study the acute effects of exercise on O-GlcNAc levels in leukocytes. The selection of the participants (healthy, young, and trained individuals) and the duration of the physical activity ensured that the workload does not exceed the adaptation capacity of the participants. Biochemical markers sensitive for tissue damage (LDH, CK)—although elevated—remained close to normal range. IL-6 levels—which are known to increase proportional to the amount of exercise—remained below 2 ng/L (data not shown). Lactate levels after exercise (6.2 ± 2.0 mM) showed that the workload corresponded to approximately the state where aerobic–anaerobic transition occurs (~ 4 mM lactate) (43). Elevated level of serum phosphate and increased number of circulating leukocytes were expected results after exercise and are in good correspondence with the literature (44–46). In our study, only male volunteers were recruited to avoid interference due to hormonal differences between sexes. However, the influence of gender or cyclic hormonal changes on O-GlcNAc regulation needs to be studied in the future. The relatively few data available

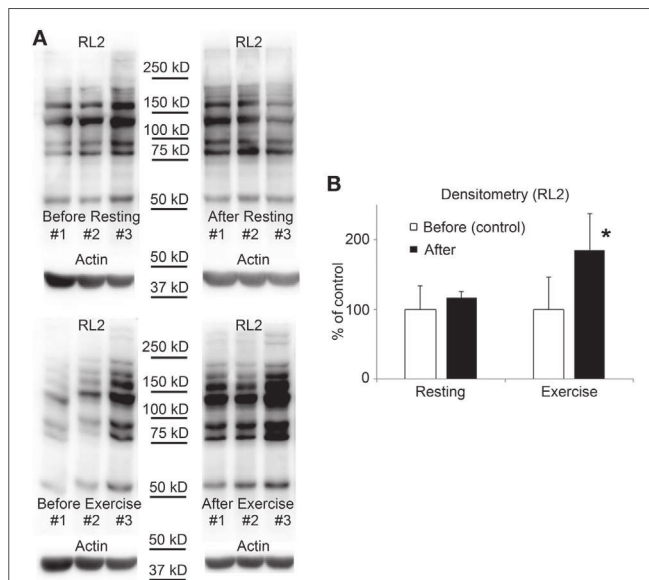


FIGURE 3 | O-GlcNAc levels elevate in leukocytes following exercise. **(A)** Western blot analysis using RL2 antibody and anti-actin antibody shows samples of white blood cells protein extracts from three individuals. Sample were collected 3 h before exercise and before resting (left panels), and also after exercise and after resting (right panels). **(B)** Densitometry analysis of the RL2 staining is expressed as a percentage of the control samples (i.e., samples collected before exercise or before resting). Each data point shows the average of six individual samples. Open bars represent the mean \pm SD of “before” samples and black bars represent the mean \pm SD of “after” samples. * $p < 0.05$ vs before exercise.

in the literature indeed suggest that O-GlcNAc interacts with hormonal receptors (46) including estrogen receptor (47, 48). It is also interesting to note that one of the regulatory enzymes of O-GlcNAc; O-GlcNAc transferase (OGT) is X-linked. Without X-inactivation, the expressional level of OGT would be approximately double in female cells (49).

Increasing amount of data demonstrates that the immune system is also influenced by physical activity, and moreover it is part of the systemic adaptation and response to physical challenges (50). Demargination of leukocytes and leukocytosis was recognized early as a consequence of physical exercise (45, 51). Limited inflammatory response can be elicited during exercise by muscle micro-injuries, bacterial translocation from the gut due to reduced blood flow or due to direct oxidative stress of various elements of the immune system (7, 37). On the other hand, activated leukocytes and inflammatory response consequently supports healing and regeneration (37, 52). There are many factors that may influence the actual outcome of the immunomodulatory effect of exercise the length and intensity of the exercise, whether it is aerobic or anaerobic and also the presence or absence of previous training exercise (53, 54). “Overreaching,” i.e., performing more strenuous exercise than the body can tolerate will lead to immunosuppression while moderate exercise will actually benefit the immune system and reduce infection incidence (50, 55). The distinction between pro- and anti-inflammatory effects of exercise is not clearly defined but it is rather a dynamic balance and the actual result is a mixture of a multitude of signaling elements (53).

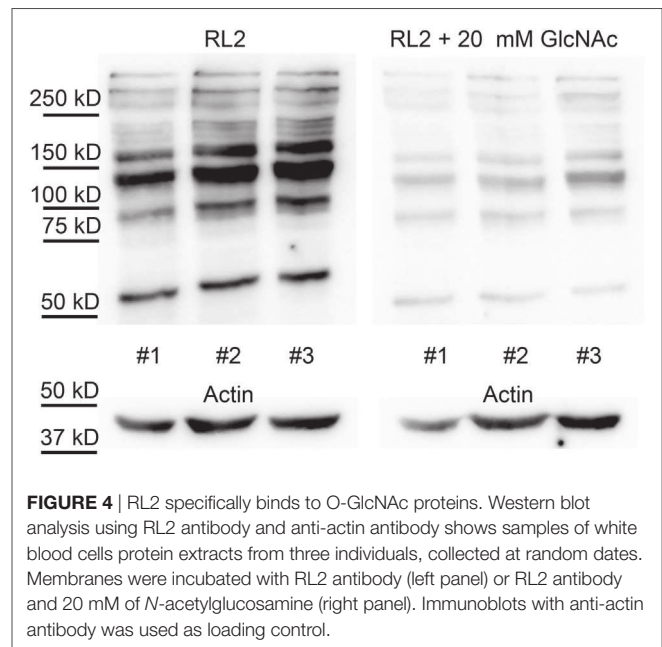


FIGURE 4 | RL2 specifically binds to O-GlcNAc proteins. Western blot analysis using RL2 antibody and anti-actin antibody shows samples of white blood cells protein extracts from three individuals, collected at random dates. Membranes were incubated with RL2 antibody (left panel) or RL2 antibody and 20 mM of *N*-acetylglucosamine (right panel). Immunoblots with anti-actin antibody was used as loading control.

As mentioned, protein O-GlcNAc modification has been proposed as a protective intracellular mechanism against various type of stress, including hypoxia, oxidative stress, heat-shock, and osmotic challenges (22). It was demonstrated previously (31, 56, 57) and we have also found in our present experiments that O-GlcNAc can elevate within minutes. Stress-induced O-GlcNAc may have several consequences: it may influence transcription (e.g., increasing the expression of heat-shock proteins), phosphorylation signaling, or protein degradation (18, 58). Immediate effects of O-GlcNAc that do not require *de novo* protein synthesis include the inhibition of enzymes involved in oxidative stress such as nitric oxide synthase (59, 60). Finally, it seems to be that O-GlcNAc may also suppress stress-induced intracellular free calcium elevation, which would otherwise lead to adverse effects (57). In our present report, we propose that O-GlcNAc modification may regulate immune response during exercise as part of the stress response system.

Several studies found that O-GlcNAc may participate in inflammatory responses (61–66), but the exact function and role of O-GlcNAc in the regulation of inflammation is still unclear (67, 68). For example, one of the key signal elements of the immune response, NF κ B was shown not only to be activated by O-GlcNAc (41, 66, 69) but also to be inhibited by O-GlcNAc (64, 65, 70). This contradiction of results is probably caused by a complex interplay between several O-GlcNAc and phosphorylation sites on NF κ B. Depending on the cell type, the duration, type and severity of stress, different posttranslational patterns may develop on NF κ B and produce different outcomes. Despite uncertainties concerning the function of O-GlcNAc modification in immune cells, accumulating data suggest that O-GlcNAc elevation in WBCs is a quick and measurable response to activation (32, 71).

Our present work is the first that shows an elevation of O-GlcNAc levels in human WBCs following acute stress, i.e., physical exercise. Only a few studies used human WBCs to measure

O-GlcNAc levels yet; in these studies, western blot and flow cytometry techniques were also used to demonstrate that O-GlcNAc levels can be assessed in human leukocytes (33, 35, 42). In contrast to western blot, flow cytometry may also allow for comparison of various subsets of leukocytes. As of now, flow cytometric studies, including our present work have only a limited resolution of leukocyte sub-types (granulocytes, lymphocytes, and monocytes) based on forward and side scatter plots. Thus our results have to be confirmed in the future by the simultaneous labeling of O-GlcNAc proteins and specific leukocyte surface markers such as CD45, CD3, CD19, CD4, CD8, etc.

A study by Myslicki et al. used human whole blood samples to measure O-GlcNAc (34). They found no correlation between whole blood O-GlcNAc and aerobic capacity (VO_{2peak}) in healthy males, however, their samples were collected only from resting individuals. The direct activator of O-GlcNAc elevation in our experimental setup is not known yet. Several physical and biochemical factors could be responsible, such as acidosis, relative hypoxia, oxidative stress, increase of temperature, myokine release from the muscles, hormonal and metabolic changes (epinephrine, norepinephrine and glucose, insulin), or increased hemodynamic shear stress due to faster circulation. Our preliminary data on a Jurkat (T-cell derived) cell culture model suggest that lactic acid alone (up to 10 mM) is not sufficient to elicit a significant increase of O-GlcNAc (data not shown). Agonist, such as epinephrine and angiotensin II (57) and/or oxidative stress (72) are also likely candidates responsible for the O-GlcNAc elevation observed in our study but so far there is no experimental evidence available in leukocytes or leukocyte-derived cells to confirm it.

Under moderate-intensity exercise, blood glucose levels should remain relatively stable; while the muscles' glucose uptake is increased during exercise, it is balanced by increased glucose production by the liver (73). Nevertheless, fluctuations in blood glucose levels could be a plausible explanation for the measured changes in O-GlcNAc levels. Hypoglycemia are known to cause a paradoxical increase in O-GlcNAcylation (74), however, it is unlikely that the duration of the exercise in our experimental setup would be sufficient to decrease glucose levels. On the contrary, the measured mean plasma glucose values—despite large individual variations—seemed to be slightly increased. Unfortunately, most studies investigated the effect of hyperglycemia with much higher glucose concentrations (25–30 mM). Moderately elevated glucose levels (~1 mM increase) were shown to increase O-GlcNAc levels only under long-term conditions (pre-diabetes) so far (35, 75).

REFERENCES

1. Gremeaux V, Gayda M, Lepers R, Sosner P, Juneau M, Nigam A. Exercise and longevity. *Maturitas* (2012) 73:312–7. doi:10.1016/j.maturitas.2012.09.012
2. Kessler HS, Sisson SB, Short KR. The potential for high-intensity interval training to reduce cardiometabolic disease risk. *Sports Med* (2012) 42:489–509. doi:10.2165/11630910-000000000-00000
3. Pedersen BK, Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports* (2006) 16(Suppl 1):3–63. doi:10.1111/j.1600-0838.2006.00520.x
4. Vasconcellos F, Seabra A, Katzmarzyk PT, Kraemer-Aguilar LG, Bouskela E, Farinatti P. Physical activity in overweight and obese adolescents: systematic

review of the effects on physical fitness components and cardiovascular risk factors. *Sports Med* (2014) 44:1139–52. doi:10.1007/s40279-014-0193-7

In summary, our study demonstrated for the first time that following a single bout of running exercise, protein O-GlcNAc modification increased in WBCs. We have also shown that the bulk of this change is attributed to lymphocytes, while granulocytes remained relatively unchanged. While the understanding of the complex function of O-GlcNAc modification in leukocytes requires further extensive studies, we believe that our results presented here will help to elucidate the role of O-GlcNAc in stress adaptation mechanisms. Implications could include the development of new diagnostic tools for the monitoring of healthy (sport medicine) and metabolically unhealthy (e.g., diabetes) population as well.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of Guidelines of the Regional Committee for Research Ethics of the University of Pécs, Hungary. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Regional Committee for Research Ethics of the University of Pécs, Hungary (approval No.: 5187).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Study design and organization of the manuscript were performed by TN, AS, IW, and AM. Data analysis, statistical analysis, and the first draft of the manuscript were performed by TN, EK, VF, TT, and AS. The manuscript review was performed by EK, VF, and TT. The final approval for publication was performed by TN, IW, and AM.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ágnes Radványi at the Department of Internal Medicine and Nephrology Center, Faculty of Medicine, University of Pécs for her contribution in enrolment and clinical assessment of the volunteers.

FUNDING

This work was supported by the EU founded Hungarian projects GINOP under Grant number 2.3.2.-15-2016-00050 and 2.3.3.-15-2016-00025 and supported by János Szentágotthai Research Centre, University of Pécs.

5. review of the effects on physical fitness components and cardiovascular risk factors. *Sports Med* (2014) 44:1139–52. doi:10.1007/s40279-014-0193-7
5. Lawler JM, Rodriguez DA, Hord JM. Mitochondria in the middle: exercise preconditioning protection of striated muscle. *J Physiol* (2016) 594:5161–83. doi:10.1113/JP270656
6. McGinnis GR, Ballmann CG, Peters B, Nannayakarra G, Roberts MD, Amin RH, et al. Interleukin-6 mediates exercise preconditioning against myocardial ischemia reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2015) 308(11):H1423–33. doi:10.1152/ajpheart.00850.2014
7. Accattato F, Greco M, Pullano SA, Carè I, Fiorillo AS, Pujia A, et al. Effects of acute physical exercise on oxidative stress and inflammatory status in young, sedentary obese subjects. *PLoS One* (2017) 12:e0178900. doi:10.1371/journal.pone.0178900

8. Barbieri E, Sestili P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct* (2012) 2012:982794. doi:10.1155/2012/982794
9. Kenney WL, Ho CW. Age alters regional distribution of blood flow during moderate-intensity exercise. *J Appl Physiol* (1995) 79:1112–9. doi:10.1152/jappl.1995.79.4.1112
10. Kim B, Lee H, Kawata K, Park J-Y. Exercise-mediated wall shear stress increases mitochondrial biogenesis in vascular endothelium. *PLoS One* (2014) 9:e111409. doi:10.1371/journal.pone.0111409
11. Ozaki H, Loenneke JP, Buckner SL, Abe T. Muscle growth across a variety of exercise modalities and intensities: contributions of mechanical and metabolic stimuli. *Med Hypotheses* (2016) 88:22–6. doi:10.1016/j.mehy.2015.12.026
12. Milisav I, Poljsak B, Šuput D. Adaptive response, evidence of cross-resistance and its potential clinical use. *Int J Mol Sci* (2012) 13:10771–806. doi:10.3390/ijms130910771
13. Berzosa C, Cebrián I, Fuentes-Broto L, Gómez-Trullén E, Piedrafita E, Martínez-Ballarín E, et al. Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men. *J Biomed Biotechnol* (2011) 2011:540458. doi:10.1155/2011/540458
14. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell* (2014) 159:738–49. doi:10.1016/j.cell.2014.10.029
15. Hoffman NJ, Parker BL, Chaudhuri R, Fisher-Wellman KH, Kleinert M, Humphrey SJ, et al. Global phosphoproteomic analysis of human skeletal muscle reveals a network of exercise-regulated kinases and AMPK substrates. *Cell Metab* (2015) 22:922–35. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.001
16. Noble EG, Shen GX. Impact of exercise and metabolic disorders on heat shock proteins and vascular inflammation. *Autoimmune Dis* (2012) 2012:836519. doi:10.1155/2012/836519
17. Martínez MR, Dias TB, Natov PS, Zachara NE. Stress-induced O-GlcNAcylation: an adaptive process of injured cells. *Biochem Soc Trans* (2017) 45:237–49. doi:10.1042/BST20160153
18. Butkinaree C, Park K, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* (2010) 1800:96–106. doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.018
19. Hahne H, Sobotzki N, Nyberg T, Helm D, Borodkin VS, van Aalten DME, et al. Proteome wide purification and identification of O-GlcNAc-modified proteins using click chemistry and mass spectrometry. *J Proteome Res* (2013) 12:927–36. doi:10.1021/pr300967y
20. Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* (2011) 80:825–58. doi:10.1146/annurev-biochem-060608-102511
21. Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Hresko RC, Mueckler MM. Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2002) 283:E241–50. doi:10.1152/ajpendo.00060.2002
22. Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress: a survival response of mammalian cells. *J Biol Chem* (2004) 279:30133–42. doi:10.1074/jbc.M403773200
23. Chatham JC, Marchase RB. The role of protein O-linked beta-N-acetylglucosamine in mediating cardiac stress responses. *Biochim Biophys Acta* (2010) 1800:57–66. doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.004
24. Vibjerg Jensen R, Johnsen J, Buus Kristiansen S, Zachara NE, Bøtker HE. Ischemic preconditioning increases myocardial O-GlcNAc glycosylation. *Scand Cardiovasc J* (2013) 47:168–74. doi:10.3109/14017431.2012.756984
25. Jones SP, Zachara NE, Ngoh GA, Hill BG, Teshima Y, Bhatnagar A, et al. Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. *Circulation* (2008) 117:1172–82. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.730515
26. Belke DD. Swim-exercised mice show a decreased level of protein O-GlcNAcylation and expression of O-GlcNAc transferase in heart. *J Appl Physiol* (2011) 111:157–62. doi:10.1152/japplphysiol.00147.2011
27. Bennett CE, Johnsen VL, Shearer J, Belke DD. Exercise training mitigates aberrant cardiac protein O-GlcNAcylation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sci* (2013) 92:657–63. doi:10.1016/j.lfs.2012.09.007
28. Cox EJ, Marsh SA. Exercise and diabetes have opposite effects on the assembly and O-GlcNAc modification of the mSin3A/HDAC1/2 complex in the heart. *Cardiovasc Diabetol* (2013) 12:101. doi:10.1186/1475-2840-12-101
29. Hortemo KH, Lunde PK, Anonsen JH, Kvaløy H, Munkvik M, Rehn TA, et al. Exercise training increases protein O-GlcNAcylation in rat skeletal muscle. *Physiol Rep* (2016) 4:e12896. doi:10.14814/phy2.12896
30. Peternej T, Marsh SA, Strobel NA, Matsumoto A, Briskey D, Dalbo VJ, et al. Glutathione depletion and acute exercise increase O-GlcNAc protein modification in rat skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* (2015) 400:265–75. doi:10.1007/s11010-014-2283-0
31. Medford HM, Porter K, Marsh SA. Immediate effects of a single exercise bout on protein O-GlcNAcylation and chromatin regulation of cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2013) 305:H114–23. doi:10.1152/ajpheart.00135.2013
32. Golks A, Guerini D. The O-linked N-acetylglucosamine modification in cellular signalling and the immune system. “Protein modifications: beyond the usual suspects” review series. *EMBO Rep* (2008) 9:748–53. doi:10.1038/embor.2008.129
33. Madsen-Butterse SA, Xu Y, Petty HR, Romero R. Quantification of O-GlcNAc protein modification in neutrophils by flow cytometry. *Cytometry A* (2008) 73:667–72. doi:10.1002/cyto.a.20569
34. Myslicki JP, Shearer J, Hittel DS, Hughey CC, Belke DD. O-GlcNAc modification is associated with insulin sensitivity in the whole blood of healthy young adult males. *Diabetol Metab Syndr* (2014) 6:96. doi:10.1186/1758-5996-6-96
35. Springhorn C, Matsha TE, Erasmus RT, Essop MF. Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* (2012) 97:4640–9. doi:10.1210/jc.2012-2229
36. Baudoin L, Issad T. O-GlcNAcylation and inflammation: a vast territory to explore. *Front Endocrinol* (2014) 5:235. doi:10.3389/fendo.2014.00235
37. Shek PN, Shephard RJ. Physical exercise as a human model of limited inflammatory response. *Can J Physiol Pharmacol* (1998) 76:589–97. doi:10.1139/y98-040
38. Army/US. *Army Physical Readiness Training*. (2012). Appendix A1-24. Available from: https://armypubs.army.mil/epubs/DR_pubs/DR_a/pdf/web/ARN7938_FM_7-22_INC_C1_Final.pdf (Accessed: April 23, 2018).
39. Sloot PM, Figdor CG. Elastic light scattering from nucleated blood cells: rapid numerical analysis. *Appl Opt* (1986) 25:3559. doi:10.1364/AO.25.003559
40. Gabriel HH, Kindermann W. Adhesion molecules during immune response to exercise. *Can J Physiol Pharmacol* (1998) 76:512–23. doi:10.1139/y98-067
41. Golks A, Tran T-T, Goetschy JF, Guerini D. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *EMBO J* (2007) 26:4368–79. doi:10.1038/sj.emboj.7601845
42. Kneass ZT, Marchase RB. Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated O-GlcNAc. *J Biol Chem* (2004) 279:45759–65. doi:10.1074/jbc.M407911200
43. Faude O, Kindermann W, Meyer T. Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sports Med* (2009) 39:469–90. doi:10.2165/00007256-200939060-00003
44. Dale G, Fleetwood JA, Weddell A, Ellis RD, Sainsbury JR. Fitness, unfit, and phosphate. *Br Med J* (1987) 294:939. doi:10.1136/bmj.294.6577.939
45. Steel JM, Steel CM, Johnstone FD. Leukocytosis induced by exercise. *Br Med J* (1987) 295:1135–6. doi:10.1136/bmj.295.6606.1135-c
46. Bowe DB, Sadlonova A, Toleman CA, Novak Z, Hu Y, Huang P, et al. O-GlcNAc integrates the proteasome and transcriptome to regulate nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* (2006) 26:8539–50. doi:10.1128/MCB.01053-06
47. Chen YX, Du JT, Zhou LX, Liu XH, Zhao YF, Nakanishi H, et al. Alternative O-GlcNAcylation/O-phosphorylation of Ser16 induce different conformational disturbances to the N terminus of murine estrogen receptor β . *Chem Biol* (2006) 13:937–44. doi:10.1016/j.chembiol.2006.06.017
48. Kanwal S, Fardini Y, Pagesy P, N'Tumba-Byn T, Pierre-Eugène C, Masson E, et al. O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor α expression and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PLoS One* (2013) 8:e61950. doi:10.1371/journal.pone.0069150
49. Olivier-Van Stichelen S, Hanover JA. X-inactivation normalizes O-GlcNAc transferase levels and generates an O-GlcNAc-depleted Barr body. *Front Genet* (2014) 5:256. doi:10.3389/fgene.2014.00256
50. Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* (2007) 103:693–9. doi:10.1152/japplphysiol.00008.2007
51. Shephard RJ. Development of the discipline of exercise immunology. *Exerc Immunol* (2010) 16:194–222.

52. Santos SA, Silva ET, Caris AV, Lira FS, Tufik S, Dos Santos RVT. Vitamin E supplementation inhibits muscle damage and inflammation after moderate exercise in hypoxia. *J Hum Nutr Diet* (2016) 29:516–22. doi:10.1111/jhn.12361
53. Gjevestad GO, Holven KB, Ulven SM. Effects of exercise on gene expression of inflammatory markers in human peripheral blood cells: a systematic review. *Curr Cardiovasc Risk Rep* (2015) 9:34. doi:10.1007/s12170-015-0463-4
54. Sakharov DA, Maltseva DV, Riabenko EA, Shkurnikov MU, Northoff H, Tonevitsky AG, et al. Passing the anaerobic threshold is associated with substantial changes in the gene expression profile in white blood cells. *Eur J Appl Physiol* (2012) 112:963–72. doi:10.1007/s00421-011-2048-3
55. Belotto MF, Magdalon J, Rodrigues HG, Vinolo MAR, Curi R, Pithon-Curi TC, et al. Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. *Clin Exp Immunol* (2010) 162:237–43. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04240.x
56. Kearse KP, Hart GW. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991) 88:1701–5. doi:10.1073/pnas.88.5.1701
57. Nagy T, Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC. Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca^{2+} elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine. *Am J Physiol Cell Physiol* (2006) 290:C57–65. doi:10.1152/ajpcell.00263.2005
58. Kazemi Z, Chang H, Haserodt S, McKen C, Zachara NE. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3beta-dependent manner. *J Biol Chem* (2010) 285:39096–107. doi:10.1074/jbc.M110.131102
59. Hilgers RHP, Xing D, Gong K, Chen Y-F, Chatham JC, Oparil S. Acute O-GlcNAcylation prevents inflammation-induced vascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2012) 303:H513–22. doi:10.1152/ajpheart.01175.2011
60. Storey KB, Wu C-W. Stress response and adaptation: a new molecular toolkit for the 21st century. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* (2013) 165:417–28. doi:10.1016/j.cbpa.2013.01.019
61. Huang J-B, Clark AJ, Petty HR. The hexosamine biosynthesis pathway negatively regulates IL-2 production by Jurkat T cells. *Cell Immunol* (2007) 245:1–6. doi:10.1016/j.cellimm.2007.03.006
62. Kneass ZT, Marchase RB. Protein O-GlcNAc modulates motility-associated signaling intermediates in neutrophils. *J Biol Chem* (2005) 280:14579–85. doi:10.1074/jbc.M414066200
63. Liu H, Wang Z, Yu S, Xu J. Proteasomal degradation of O-GlcNAc transferase elevates hypoxia-induced vascular endothelial inflammatory response†. *Cardiovasc Res* (2014) 103:131–9. doi:10.1093/cvr/cvu116
64. Nöt LG, Brocks CA, Vámhidy L, Marchase RB, Chatham JC. Increased O-linked beta-N-acetylglucosamine levels on proteins improves survival, reduces inflammation and organ damage 24 hours after trauma-hemorrhage in rats. *Crit Care Med* (2010) 38:562–71. doi:10.1097/CCM.0b013e3181cb10b3
65. Xing D, Gong K, Feng W, Nozell SE, Chen Y-F, Chatham JC, et al. O-GlcNAc modification of NFκB p65 inhibits TNF-α-induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One* (2011) 6:e24021. doi:10.1371/journal.pone.0024021
66. Zhang D, Cai Y, Chen M, Gao L, Shen Y, Huang Z. OGT-mediated O-GlcNAcylation promotes NF-κB activation and inflammation in acute pancreatitis. *Inflamm Res* (2015) 64:943–52. doi:10.1007/s00011-015-0877-y
67. Johnson B, Opimba M, Bernier J. Implications of the O-GlcNAc modification in the regulation of nuclear apoptosis in T cells. *Biochim Biophys Acta* (2014) 1840:191–8. doi:10.1016/j.bbagen.2013.09.011
68. Nagy T, Miseta A, Kovacs L. Protein-associated O-GlcNAc, a multifunctional mechanism in cell signaling and its role in the pathogenesis of diabetes, stress and malignant diseases. *Biochem Med* (2007) 17:162–77. doi:10.11613/BM.2007.015
69. Yang WH, Park SY, Nam HW, Kim DH, Kang JG, Kang ES, et al. NFκB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105:17345–50. doi:10.1073/pnas.0806198105
70. Zou L, Yang S, Champattanachai V, Hu S, Chaudry IH, Marchase RB, et al. Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF-κB signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2009) 296:H515–23. doi:10.1152/ajpheart.01025.2008
71. Lund PJ, Elias JE, Davis MM. Global analysis of O-GlcNAc glycoproteins in activated human T cells. *J Immunol* (2016) 197:3086–98. doi:10.4049/jimmunol.1502031
72. Kátai E, Pál J, Poór VS, Purewal R, Miseta A, Nagy T. Oxidative stress induces transient O-GlcNAc elevation and tau dephosphorylation in SH-SY5Y cells. *J Cell Mol Med* (2016) 20:2269–77. doi:10.1111/jcmm.12910
73. Adams OP. The impact of brief high-intensity exercise on blood glucose levels. *Diabetes Metab Syndr Obes* (2013) 6:113–22. doi:10.2147/DMSO.S29222
74. Taylor RP, Parker GJ, Hazel MW, Soesanto Y, Fuller W, Yazzie MJ, et al. Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* (2008) 283:6050–7. doi:10.1074/jbc.M707328200
75. Park K, Saudek CD, Hart GW. Increased expression of β-N-acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes. *Diabetes* (2010) 59:1845–50. doi:10.2337/db09-1086

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Nagy, Kátai, Fisi, Takács, Stréda, Wittmann and Miseta. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.