

# 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰对 tau 蛋白磷酸化修饰的影响

钱 慰<sup>1)</sup> 刘 飞<sup>2)</sup> 朱 俐 龚成新<sup>2)</sup> 金淑仪<sup>1)\*</sup>

(<sup>1)</sup>南通医学院生物化学教研室, 南通 226001;

(<sup>2)</sup>Department of Neurochemistry, NYS Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, New York 10314, USA)

**摘要** 蛋白质的 O 位 N-乙酰葡萄糖胺 (O-GlcNAc) 糖基化修饰是一种新近发现的广泛存在于细胞核蛋白与细胞浆蛋白的蛋白质翻译后修饰。其性质与经典的膜蛋白和分泌蛋白的糖基化修饰不同, 而与蛋白质磷酸化修饰更相似。O-GlcNAc 糖基化和磷酸化均修饰 tau 蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基, 通过改变 O-GlcNAc 糖基化供体底物浓度以及其关键酶活性等方法, 改变分化后成神经细胞样的 PC12 细胞中的蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰水平, 然后用特异性识别不同位点磷酸化的 tau 蛋白抗体, 进行蛋白质印迹分析来检测 tau 蛋白磷酸化水平的变化。结果发现细胞内蛋白质 O-GlcNAc 糖基化对 tau 蛋白磷酸化的影响, 在不同的磷酸化位点其影响不同。增加蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰导致 tau 蛋白大多数磷酸位点的磷酸化水平降低, 反之亦然。这些结果说明, tau 磷酸化在大多数位点受到 O-GlcNAc 糖基化修饰的负性调节。这一研究为阐明调节 tau 蛋白磷酸化水平的机理和阿尔茨海默病脑中 tau 异常过度磷酸化的分子机制提供了新的线索。

**关键词** tau, 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰, 蛋白质磷酸化, OGT, O-GlcNAcase, 阿尔茨海默病

**学科分类号** Q513

蛋白质的 O 位 N-乙酰葡萄糖胺修饰 (O-GlcNAc 糖基化修饰) 是一种新近发现的、广泛发生在细胞质与细胞核内的、动态的蛋白质翻译后修饰方式。它是指单个 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, GlcNAc) 以 O-糖苷键与蛋白质的丝氨酸或苏氨酸的羟基相连接<sup>[1,2]</sup>。从特性上看, O-GlcNAc 糖基化更像磷酸化修饰, 而不同于经典糖基化修饰。与经典的糖基化修饰比较, 蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修饰有三个主要特征: a. O-GlcNAc 糖基化修饰发生于核质和胞质中, 而不是在内质网和高尔基体中, 因而被 O-GlcNAc 修饰的蛋白质绝大多数为胞浆蛋白或核蛋白。b. O-GlcNAc 修饰具有高度的动态性, 根据细胞信号以及细胞所处的阶段, O-GlcNAc 修饰处于快速循环之中, 这一特性与蛋白质的磷酸化相似, 很可能也起信号转导作用。c. 至今所发现的所有被 O-GlcNAc 糖基化修饰的蛋白质都是磷蛋白, 因此, 蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化与磷酸化修饰之间必定有一定的联系<sup>[3]</sup>。

与蛋白质的磷酸化受蛋白激酶与磷酸酯酶的双重调控相似, 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化程度也是 O-GlcNAc 糖基转移酶 (OGT) 和 O-GlcNAc 糖苷酶 (O-GlcNAcase) 共同作用的结果。前者是催化 GlcNAc 连接到肽链的丝氨酸或苏氨酸残基上的酶。后者是将 O-GlcNAc 从蛋白质肽链上水解的

酶。抑制其活性使蛋白质 O-GlcNAc 糖基化程度明显增加。

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种发病率颇高的渐进性大脑退行性病变, 但其发病机理尚不清楚。很多证据表明, tau 蛋白的异常过度磷酸化是 AD 致病过程中的关键事件<sup>[4]</sup>。因此, 控制 tau 蛋白磷酸化水平是 AD 防治研究中极其活跃的领域。然而, 在 AD 脑中导致 tau 异常过度磷酸化的机理尚不完全清楚。

tau 蛋白除被磷酸化修饰外, 最近研究发现也被 O-GlcNAc 糖基化修饰<sup>[5,6]</sup>。从牛脑中提纯的 tau 蛋白, 平均每分子 tau 可被四分子的 O-GlcNAc 糖基化修饰, 而且多达 12 个丝氨酸和苏氨酸残基可被 O-GlcNAc 糖基化修饰<sup>[5]</sup>。

由于蛋白质 O-GlcNAc 糖基化影响同一蛋白质磷酸化水平的现象已在几种胞浆蛋白中观察到<sup>[2,3,7]</sup>, O-GlcNAc 可能调节 tau 蛋白的磷酸化水平。介于 tau 蛋白磷酸化的失调以及异常过度磷酸化在 AD 发病机理中的重要性, 本文利用 PC12 细胞神经生长因子诱导分化成神经元样细胞模型,

\* 通讯联系人。

Tel: 0513-5517191-3602, E-mail: weiqian@ntmc.edu.cn

收稿日期: 2003-01-07, 接受日期: 2003-03-03

研究了 O-GlcNAc 糖基化修饰对 tau 磷酸化的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞、培养基及质粒:** PC12 细胞 (大鼠嗜铬细胞瘤细胞) 为美国 American Type Culture Collection 公司产品. 人 OGT 的 cDNA 由美国国立卫生研究院 Hanover 博士惠赠. pCI-neo/tau<sub>441</sub> 由日本物理化学研究所 Takashima 教授惠赠. pcDNA3.1/CT 真核细胞表达质粒、RPMI 1640 基础培养基、不含葡萄糖的 RPMI 基础培养基、OPTI-MEM I 培养基均为 Invitrogen 公司产品.

**1.1.2 凝集素以及抗体:** Succinyl WGA-HRP 为美国 EY Laboratories 公司产品. PHF-1 (单克隆抗体, 特异识别 Ser396/Ser404 两位点磷酸化的 tau 蛋白) 由美国爱因斯丹大学 Davits 教授惠赠. 12E8 (单克隆抗体, 特异识别在 Ser262/Ser356 两位点磷酸化的 tau 蛋白) 来自 Athena Neurosciences 的 Schenk 教授. 抗 tau [pS<sup>362</sup>] (多克隆抗体, 识别特殊位点 Ser262 磷酸化的 tau 蛋白) 和抗 tau [pS<sup>214</sup>] (多克隆抗体, 识别特殊位点 Ser214 磷酸化的 tau 蛋白) 为 Biosource International 公司产品. 134d (多克隆抗体, 识别磷酸化和非磷酸化的 tau) 为美国纽约州立基础研究所神经生化系自行研制. <sup>125</sup>I 标记的抗鼠和抗兔抗体为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品.

**1.1.3 其他试剂和材料:** 六孔细胞培养板购自 Corning Incorporated 公司. Streptozotocine (STZ) 为 Sigma 公司产品. D-(+)-Glucose 为 Sigma 公司产品. mNGF 为 Alomone Labs 公司产品. Lipofectamine™ 2000 试剂为 Invitrogen 公司产品. BisBenzimide H 33258 为 Sigma 公司产品. Xho I、Not I 为 Biolabs 公司产品. Dneasy Tissue Kit (用于提取基因组 DNA) 为 Qiagen 公司产品. Plasmid Madi Kit (用于中等量抽提质粒) 为 Qiagen 公司产品. Gel Extraction Kit (用于从琼脂糖凝胶中纯化 DNA 片段) 为 Qiagen 公司产品. FUJI Imaging Plate 为 FUJI PHOTO FILM 公司产品. Immobilon™-P PVDF 膜为 Millipore 公司产品.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** PC12 细胞培养在含 10% 马血清和 5% 小牛血清的 RPMI 1640 基础培养基中,

培养条件为 37°C, 5% 的 CO<sub>2</sub>, 每隔 2~3 天换液一次.

**1.2.2 pcDNA3.1-OGT 真核表达质粒的构建和扩增:** 我们将 31 kb 长的人 OGT 的 cDNA 通过 Not I 和 EcoRV 插入到真核表达载体 pcDNA3.1 中. 将此重组质粒转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在克隆并鉴定后大量扩增. 用 QIAGEN 公司的 Madi 试剂盒抽提质粒 (根据说明书所述步骤进行). 测定 A<sub>260</sub> 以确定质粒 DNA 浓度. -20°C 储存备用.

### 1.2.3 细胞的处理

**STZ 处理和高糖处理:** 在细胞转至用胶原包被过的六孔培养板的第二天, 换成含有 50  $\mu$ g/L NGF 的上述相同培养基, 在同样条件下培养 2 天, 以诱导细胞分化. 2 天后, 用不含血清, 含不同浓度的葡萄糖和 50  $\mu$ g/L NGF 的 RPMI 1640 继续培养 4 天, 中间换液一次. 4 天后, 仍然以上述培养基但含不同浓度的 STZ 继续培养细胞 8 h. 然后收集细胞作进一步分析.

**饥饿处理:** 培养在六孔培养板中的细胞在接种后的第二天, 换成含有 50  $\mu$ g/L NGF、葡萄糖和血清的 RPMI 1640 诱导培养细胞 7 天, 中间换液 2 次. 第 8 天开始换成不含葡萄糖和血清, 但仍含有 50  $\mu$ g/L NGF 的 RPMI 1640 进行饥饿处理不同时间, 然后收集细胞.

**质粒转染:** 将 PC12 细胞, 按  $1.5 \times 10^5$  个细胞/孔培养于六孔培养板中, 使细胞在每个孔中约达到 70%~80% 汇片, 用含 10% 马血清和 5% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱, 在 37°C 培养过夜. 第二天, 用 PCI-neo-tau (野生型) 及 pcDNA3.1-OGT 质粒转染细胞. OGT 质粒与 tau 质粒的质量比分别为 1:1, 2:1. 转染根据 Invitrogen 公司在 lipofectamine 2000 试剂说明书中所提供的方法进行. 在转染 4 h 后, 换上含 50  $\mu$ g/L NGF 和 10% 马血清、5% 小牛血清的 RPMI 1640 生长培养基培养 44 h 后, 收获细胞. 每孔用不同方法处理的细胞都用 150  $\mu$ l 1 $\times$  样品缓冲液裂解收集细胞 (1 $\times$  样品缓冲液中加入 100  $\mu$ mol/L 正钒酸钠, 50 mmol/L NaF, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA). 收集液在沸水浴中煮 4 min, 而后用探头式超声波处理 20 次, 16 000 $\times$ g 离心 15 min, 收集上清, 储存于 -20°C 备用.

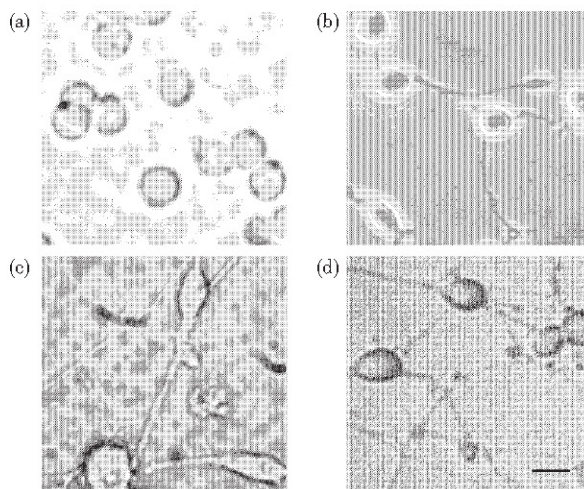
**1.2.4 蛋白质印迹分析:** 蛋白质印迹和凝集素印迹按照已发表的方法完成<sup>[8,9]</sup>.

**1.2.5 Hoechst 33258 染色:** 培养在六孔培养板上的细胞, 经 PBS 轻轻洗涤后, 用 4% 的甲醛固定细胞 30 min, 然后再用 1 mg/L 的 Hoechst 33258 试剂染色 45 min. 最后在荧光显微镜下观察并拍照.

## 2 结 果

### 2.1 NGF 诱导 PC12 细胞分化

我们采用分化后的 PC12 细胞, 从细胞水平研究蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修饰对 tau 蛋白的磷酸化修饰的影响. PC12 细胞在 NGF 的诱导下分化为神经样细胞, 从相差显微镜照片中可见, PC12 细胞在诱导分化 8 天后, 其突触交织成网状, 与诱导前的细胞形态截然不同 (图 1). PC12 细胞经诱导后内源性 tau 蛋白表达增加<sup>[10]</sup>.



**Fig. 1 Differentiation of PC12 cells induced by NGF**

PC12 cells were cultured for 8 days in the medium with 50  $\mu\text{g/L}$  NGF and observed with phase contrast microscope. (a) before differentiation; (b) differentiation for 2 days; (c) differentiation for 5 days; (d) differentiation for 8 days. Bar: (a) ~ (d) 20  $\mu\text{m}$ .

### 2.2 增高 O-GlcNAc 糖基化使 tau 磷酸化降低

为了增高细胞内蛋白质的 O-GlcNAc 修饰水平, 我们用 STZ 处理分化后的 PC12 细胞. STZ 能进入细胞并抑制 GlcNAc 糖苷酶活性, 从而增加细胞内蛋白质 O-GlcNAc 修饰<sup>[11]</sup>. 当用 2 mmol/L 或 5 mmol/L STZ 处理分化后的 PC12 细胞 8 h 后, 用 sWGA 检测到蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平增高 (图 2a), 并且这种增高与 STZ 的剂量相关. PC12 细胞经 STZ 处理后, 其 tau 蛋白的表达

水平不受影响 (图 2a). 然而用磷酸依赖性和位点特异性的 tau 抗体检测发现 STZ 对 tau 蛋白不同部位的磷酸化水平有不同影响. 如图 2A 所示, STZ 处理降低 Ser262 和 Ser356 (12E8 位点) 的磷酸化水平, 而 PHF-1 位点 (Ser396/Ser404) 的磷酸化增加, 对 Ser214 位点的磷酸化水平无明显影响.

由于 STZ 可能有细胞毒性<sup>[11]</sup>, 我们用 Hoechst33258 试剂检测了经 STZ 处理后, PC12 细胞是否发生凋亡. 结果发现经 2 mmol/L STZ 处理 8 h 后, 已可见部分细胞凋亡现象, 而经 5 mmol/L STZ 处理后, 大部分 PC12 细胞发生凋亡 (图 3). 这提示我们观察到上述 tau 蛋白磷酸化的改变可能是 STZ 毒性的结果. 因此, 我们也采用了另外两种非毒性的方法来增加 PC12 细胞内蛋白 O-GlcNAc 糖基化修饰, 以研究其对 tau 磷酸化的影响.

第一种方法是提高 PC12 细胞培养液的葡萄糖浓度 (从通常用的 5 mmol/L 到 20 mmol/L). 葡萄糖是氨基己糖途径的起始底物. 提高葡萄糖含量会导致细胞内蛋白 O-GlcNAc 糖基化修饰的供体 UDP-GlcNAc 增多, 从而增加蛋白质 O-GlcNAc 修饰<sup>[12]</sup>. 我们经 sWGA 凝集素检测, 发现 PC12 细胞在 20 mmol/L 葡萄糖的培养液中其蛋白 O-GlcNAc 糖基化修饰明显增高 (图 2b). 第二种方法是通过质粒转染技术增加 PC12 细胞的 OGT 表达, 从而达到提高细胞内蛋白质 O-GlcNAc 修饰水平的目的. 为了便于 tau 的检测, 我们同时转染人 tau 蛋白基因以增加 PC12 细胞 tau 蛋白的表达量. 结果显示 OGT 转染后 PC12 细胞的蛋白 O-GlcNAc 糖基化修饰明显增高 (图 2c).

我们随后检测了经上述两种非毒性方法导致 PC12 细胞中蛋白 O-GlcNAc 修饰增高后, 其 tau 蛋白磷酸化在不同位点的改变. 结果发现增高蛋白 O-GlcNAc 修饰导致相应的 tau 蛋白在 Ser214, Ser262, 12E8 位点 (Ser262/Ser356) 和 PHF-1 位点 (Ser396/Ser404) 等位点的磷酸化水平降低 (图 2b, c).

与 STZ 和高糖处理不同, 用 OGT 质粒转染 PC12 细胞后导致其 tau 的表达降低 (图 2c). 因此, 我们在定量分析 tau 蛋白在不同位点的磷酸化水平时, 校正了因样品中 tau 含量不同所导致的偏差. 所以, 图 2c 右侧的柱形图表示单位量 tau 蛋白在特定位点的磷酸化水平.



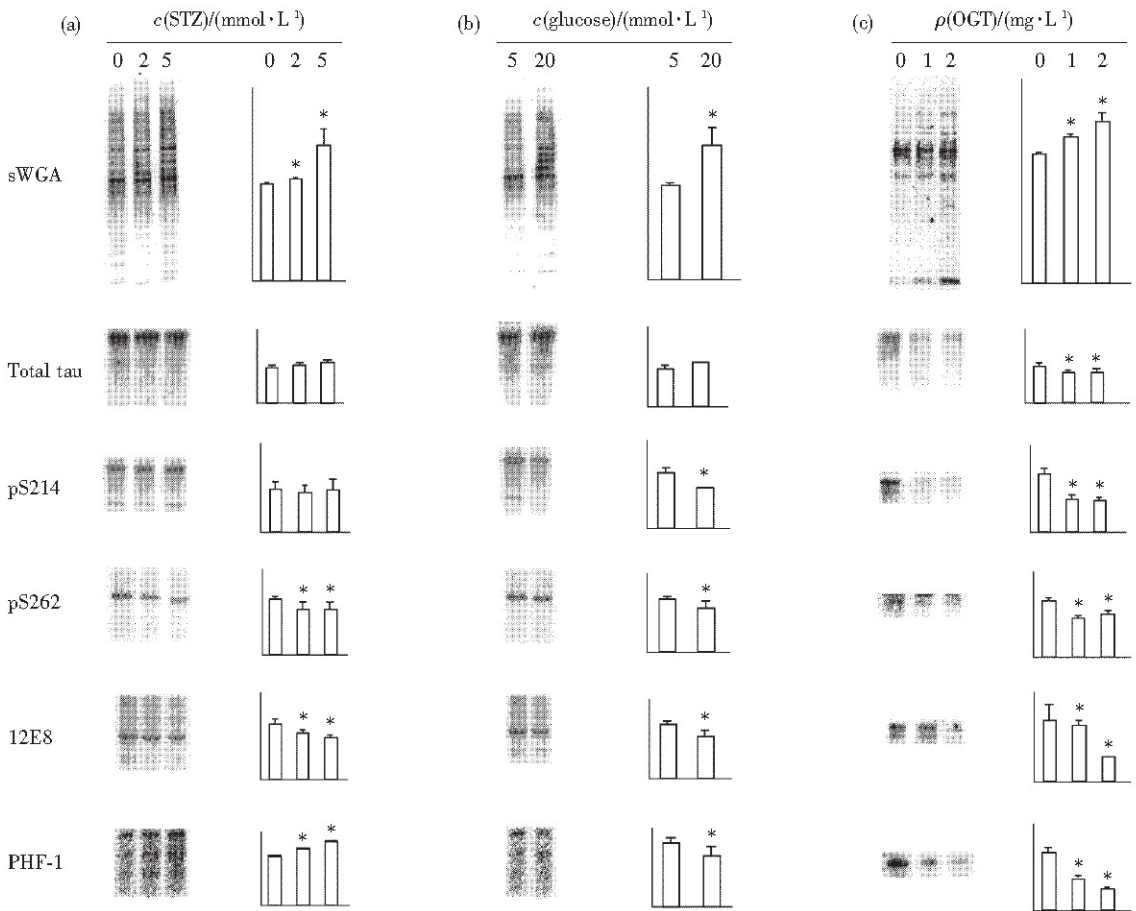


Fig. 2 The effect of increasing protein O-GlcNAcylation on tau phosphorylation at various sites

\*  $P < 0.05$ .

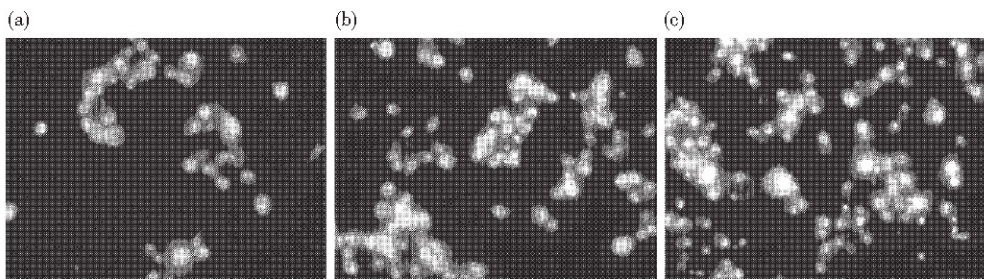


Fig. 3 Apoptosis of PC12 cells induced by STZ

(a) 0 mmol/L; (b) 2 mmol/L; (c) 5 mmol/L.

### 2.3 降低 O-GlcNAc 糖基化使 tau 磷酸化升高

与上述增高培养基葡萄糖浓度相反,我们用无葡萄糖的培养基培养 NGF 诱导分化 8 天的 PC12 细胞 8 h,以降低细胞内蛋白 O-GlcNAc 糖基化水平.蛋白质印迹分析结果显示(图 4),sWGA 的染色浓度减弱,说明细胞内蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修饰水平降低.我们同时发现降低 O-GlcNAc

糖基化导致 tau 在 Ser214, Ser262, Ser356 (12E8 位点)等位点的磷酸化水平升高,而对 PHF-1 位点的 tau 磷酸化无影响(图 4).由于 PC12 细胞在无葡萄糖培养基中培养 8 h 后其 tau 蛋白的表达量有所下降(图 4),tau 蛋白各位点的磷酸化抗体检测结果都是用此 tau 蛋白的表达量进行了校正处理的.

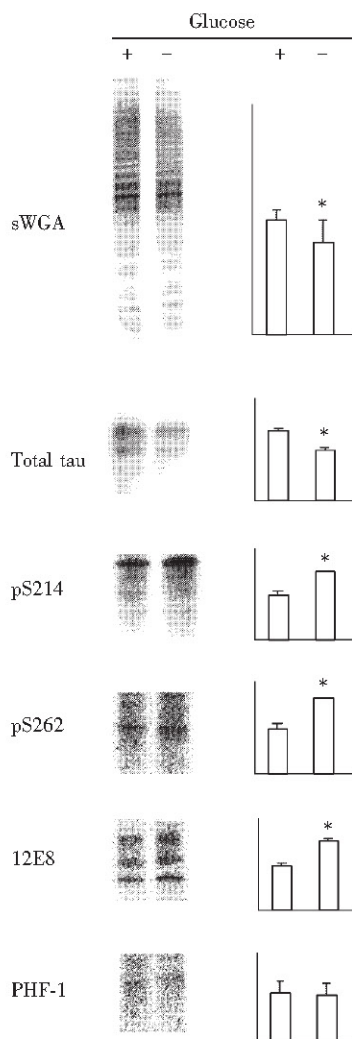


Fig. 4 The effect of decreasing protein O-GlcNAcylation on tau phosphorylation at various sites

\*  $P < 0.05$ .

### 3 讨 论

本研究用分化后的 PC12 细胞作为模型, 研究了蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰对 tau 蛋白磷酸化的影响。当采用三种非毒性的方法 (即用高糖培养、OGT 转染和细胞饥饿) 来改变细胞内蛋白质 O-GlcNAc 糖基化水平, 我们发现 tau 蛋白在 Ser214, Ser262, Ser356, Ser396 和 Ser404 等位点的磷酸化水平受 O-GlcNAc 糖基化修饰的负性调节, 即增高蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰水平导致这些位点的磷酸化水平降低, 反之亦然。这一结果可能是由于 tau 的这些丝氨酸残基除了可被磷酸化外, 也可被 O-GlcNAc 糖基化。增加这些位点的糖

基化使它们被 O-GlcNAc 糖基化所占据, 因而不能被磷酸化。所以对于这些既可能被 O-GlcNAc 糖基化又可能被磷酸化的丝氨酸位点来讲, 其 O-GlcNAc 糖基化与磷酸化可显现竞争性的“阴阳”关系。这一现象已在其他蛋白质中的某些特定位点被观察到<sup>[2,3,7]</sup>。

当用 STZ 来增高细胞内蛋白 O-GlcNAc 糖基化修饰水平以研究其对 tau 磷酸化的影响时, 我们发现 tau 在 PHF-1 位点的磷酸化水平升高。这一改变与高糖或 OGT 转染的结果相反。这种 STZ 特有的改变可能是因为 STZ 的毒性导致 PC12 细胞凋亡所致。很多研究表明, 当细胞凋亡时, 细胞内一些蛋白激酶被激活而导致 tau 蛋白在一些位点的磷酸化<sup>[13]</sup>。

蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修饰受到几方面的调控: 首先是直接参与蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修饰的两种酶, 包括将 O-GlcNAc 转移到蛋白质上的酶 OGT 和将 O-GlcNAc 从蛋白质上去除的酶 O-GlcNAcase; 其次, 从供体角度而言, 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰的供体底物为 UDP-GlcNAc, 它是氨基己糖合成途径的终产物, 而葡萄糖是此合成途径的原料。我们正是从这几方面对细胞进行了处理。从细胞来看, O-GlcNAc 糖基化程度的升高或降低对 tau 蛋白的磷酸化水平确有明显的影响。这方面的研究, 将为解开 tau 蛋白磷酸化水平在体内的调节之谜以及阐明 tau 在 AD 脑中异常过度磷酸化的分子机制提供新的视角, 并有助于建立预防和治疗早老性痴呆和其他一些与 tau 有关疾病的方法。

致谢 本研究承蒙美国国家卫生研究院 (NIH) 和美国李氏基金会 (Li Foundation) 的课题经费 (龚成新) 资助。

### 参 考 文 献

- Hart G W. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem*, 1997, **66**: 315~335
- Haltiwanger R S, Busby S, Grove K, *et al.* O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **231** (2): 237~242
- Comer F I, Hart G W. O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J Biol Chem*, 2000, **275** (38): 29179~29184
- Iqbal K, Alonso A C, Gong C X, *et al.* Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *J Neural Transm*, 1998, **53**: 169~180

- 5 Arnold C S, Johnson G V W, Cole R N, *et al.* The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*, 1996, **271** (46): 28741~28744
- 6 Tony L, Stephanie F, Dupont-Wallois L, *et al.* Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of tau proteins—a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1619** (2): 167~176
- 7 Comer F I, Hart G W. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochem*, 2001, **40** (26): 7845~7852
- 8 Cheng-Xin G, Theodore L, Jerzy W, *et al.* Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. *J Biol Chem*, 2000, **275** (8): 5535~5544
- 9 Fei L, Tanweer Z, Khalid I, *et al.* Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Letters*, 2002, **512** (1~3): 101~106
- 10 Smith C J, Anderton B H, Davis D R, *et al.* tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells. *FEBS Lett*, 1995, **375** (3): 243~248
- 11 Roos M D, Xie W, Su K, *et al.* Streptozotocin, an analog of N-acetylglucosamine, blocks the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins. *Proc Assoc Am Physciaians*, 1998, **110** (5): 422~432
- 12 Dong D L Y, Hart G W. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl- (3-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem*, 1994, **269** (30): 19321~19330
- 13 Guroff G. PC12 cells as a model of neuronal differentiation. In: Bottenstein J, Sato G, eds. *Cell Culture in The Neurosciences*. New York: Plenum Press, 1985. 245~272

## The Effect of O-GlcNAcylation on Phosphorylation of tau

QIAN Wei<sup>1)</sup>, LIU Fei<sup>2)</sup>, ZHU Li, GONG Cheng-Xin<sup>2)</sup>, JIN Shu-Yi<sup>1)\*</sup>

<sup>1)</sup> *Department of Biochemistry, Nantong Medical College, Nantong 226001, China;*

<sup>2)</sup> *Department of Neurochemistry, NYS Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, New York 10314, USA)*

**Abstract** O-GlcNAcylation of proteins is a recently discovered post-translational modification of nuclear and cytoplasmic proteins. This modification is similar to protein phosphorylation rather than to classical protein glycosylation of membrane and secreted proteins. Both O-GlcNAcylation and phosphorylation modify the hydroxyl group of serine or threonine residues of tau, the effect of O-GlcNAcylation on phosphorylation of tau was studied. The level of O-GlcNAcylation in differentiated PC12 cells was modulated by changing the concentration of the donor of O-GlcNAcylation and activities of the key enzymes, then, the consequent changes of tau phosphorylation at various phosphorylation sites were examined by using Western blot developed with phosphorylation-dependent and site-specific tau antibodies. It was found that O-GlcNAcylation modulated phosphorylation of tau at many phosphorylation sites and in a site-specific manner. Increased protein O-GlcNAcylation induced a decrease in tau phosphorylation at most of phosphorylation sites, and vice versa. These results suggest that O-GlcNAcylation negatively modulates tau phosphorylation at most phosphorylation sites. Therefore, these studies provide novel insight into the regulation of tau phosphorylation and the molecular mechanism of abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease brain.

**Key words** tau, protein O-GlcNAcylation, protein phosphorylation, OGT, O-GlcNAcase, Alzheimer disease

\* Corresponding author. Tel: 86-513-5517191-3602, E-mail: weiqian@ntmc.edu.cn

Received: January 7, 2003 Accepted: March 3, 2003