

含溴结构域蛋白2结构与功能的研究进展

周磊^{1,2} 韩一帆^{1,2} 段志强^{1,2*}

(¹贵州大学, 高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室/贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室, 贵阳 550025; ²贵州大学, 动物科学学院, 贵阳 550025)

摘要 含溴结构域蛋白2(bromodomain-containing protein 2, BRD2)具有两个串联的溴结构域和一个末端外结构域, 是溴结构域和末端外结构域蛋白家族成员之一。BRD2蛋白能够特异性结合组蛋白乙酰化赖氨酸, 参与基因的转录调控、染色质重塑和细胞增殖与凋亡等生物学活动。近年来研究表明, BRD2蛋白通过溴结构域和乙酰化组蛋白之间的表观遗传相互作用来调控基因转录和细胞周期、神经发育、炎症和脂肪生成, 并且在肿瘤细胞增殖以及病毒感染和复制过程中也有着重要作用。该文主要从BRD2蛋白的结构特征、细胞功能和参与病毒复制的作用机制等方面进行综述, 以期深入研究BRD2蛋白的功能提供参考。

关键词 含溴结构域蛋白2; 细胞功能; 基因转录; 病毒复制

Advances in the Structure and Function of Bromodomain-Containing Protein 2

ZHOU Lei^{1,2}, HAN Yifan^{1,2}, DUAN Zhiqiang^{1,2*}

(¹Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountains Region, Ministry of Education (Guizhou University)/Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in Guizhou Province, Guiyang 550025, China; ²College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract BRD2 (bromodomain-containing protein 2) is a member of the bromodomain and extra-terminal domain family, which has two tandem bromodomains and one extra-terminal domain. BRD2 protein can specifically bind histone acetylated lysine and participate in gene transcriptional regulation, chromatin remodeling, cell proliferation and apoptosis and other biological activities. Recently, studies have shown that BRD2 regulates gene transcription, cell cycle, neurodevelopment, inflammation and lipogenesis through the epigenetic interaction between bromodomain and acetylated histone in the process of cell proliferation and differentiation, and also plays important roles in promoting tumor cell proliferation and mediating potential virus infection and replication. This review focuses on the structural characteristics and cellular functions of BRD2 and also the mechanisms of BRD2-participated in virus replication, which provide useful references for further studying the functions of BRD2.

Keywords bromodomain-containing protein 2; cellular function; gene transcription; virus replication

收稿日期: 2020-10-21 接受日期: 2021-01-18

国家自然科学基金(批准号: 31960698、31760732、31502074)、贵州省基础研究计划(科学技术基金)(批准号: 黔科合基础(2020)1Y134)和贵州省科技计划项目(批准号: 黔科合平台人才(2017)5788号)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0851-88298005, E-mail: zqduan@gzu.edu.cn

Received: October 21, 2020 Accepted: January 18, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31960698, 31760732, 31502074), Guizhou Basic Research Project (Science and Technology Fund) (Grant No.QKHJC (2020) 1Y134), and Guizhou Science and Technology Planning Project (Grant No.QKHPTRC (2017) 5788)

*Corresponding author. Tel: +86-851-88298005, E-mail: zqduan@gzu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5517>

在真核细胞中, 组蛋白乙酰化主要由组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)共同调节。组蛋白乙酰化被认为是最活跃的蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)方式, 其主要通过中和赖氨酸正电荷破坏组蛋白和DNA之间的相互作用, 使染色质的转录活性变为开放状态并调节各种细胞过程^[1-2]。研究表明, 大多数HAT相关的转录激活因子均存在溴结构域(bromodomain, BD), 它可以与乙酰化赖氨酸特异性地相互作用, 并作为一个染色质靶向模块, 破译“组蛋白乙酰化密码”完成PTMs^[2]。

研究表明, 人类蛋白质组中包含46个含BD结构域的蛋白质, 对应61种BD结构域^[3]。BD结构域存在于许多与染色质相关的蛋白中, 如核组蛋白乙酰转移酶、ATP依赖的染色质重塑因子和溴结构域和末端外结构域蛋白家族(bromodomain and extra-terminal domain, BET)^[4]。BET家族成员主要包括含溴结构域蛋白2(bromodomain-containing protein 2, BRD2)、BRD3、BRD4和含溴结构域睾丸特异性蛋白(bromodomain testis-specific protein, BRDT)^[5]。BRD2又称RING3, 其基因定位于人类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的II类区域, 位于人白细胞抗原基因(human leukocyte antigen, HLA)末端的CpG岛, 与果蝇雌性不育同源异型基因(female sterile homeotic, FSH)具有高度同源性^[6]。研究人员在筛选影响酵母小核糖核蛋白(small nuclear ribonucleoprotein, snRNPs)合成的基因时, 鉴定了一种温度敏感的突变体, 将其命名为含溴结构域因子1(bromodomain factor 1, BDF1), 它在体外可结合组蛋白H3和H4, 因此被认为在染色质重塑中起重要作用^[7]。通过对BDF1、FSH和BRD2蛋白序列的比较, 发现它们均存在三个保守的结构域, 即两个串联的N末端BD结构域和一个C末端外结构域(extra-terminal domain, ET), 且BD和ET结构域在BET蛋白家族成员中普遍存在。近年来, 研究还发现BRD2蛋白与神经发育、炎症、脂肪生成, 以及病毒的复制增殖过程密切相关。因此, 本文将从BRD2蛋白的结构特征、细胞生物学功能和在病毒复制增殖中的作用机制等方面进行综述, 以期对深入了解和研究BRD2蛋白的功能提供参考。

1 BRD2的结构特征

在人和哺乳动物中, BET蛋白家族具有相似的

氨基酸序列、蛋白功能结构域和功能特性。Uniport数据库显示, 人BRD2蛋白、BRD3蛋白和BRDT蛋白分别包含801、726和947个氨基酸, 而BRD4蛋白包含三种亚型, 其氨基酸长度分别为1362、794和722个氨基酸^[8]。尽管BET蛋白家族成员之间氨基酸残基长度不同, 但是它们均含有两个N末端BD结构域和一个C末端ET结构域(图1)。此外, BRD4蛋白还具有一个与正性转录延伸因子b(positive transcription elongation factor b, P-TEFb)结合的结构域(p-TEFb-interacting domain, PID), 主要参与RNA聚合酶II(RNA polymerase II, RNA pol II)依赖的转录过程, 并在转录过程中调节P-TEFb活性^[9]。BD结构域最早发现于果蝇的brahma蛋白, 大约由110个氨基酸残基组成, 它能特异性地识别并结合组蛋白中乙酰化的赖氨酸残基; ET结构域则是由约80个氨基酸组成的保守区域, 通过招募特定效应蛋白来实现其调节基因转录的功能^[10]。BD结构域的空间构型为左手螺旋且反向平行的四个束状结构, 即由 αZ 、 αA 、 αB 、 αC 四个 α 螺旋构成的ZA-Loop和BC-Loop两个连接环, 形成疏水结构域参与乙酰化赖氨酸识别^[2]。通过比对人BRD2蛋白BD1和BD2结构域的三级结构, 发现BD1和BD2的ZA-Loop构象不同(图2)。因此, 不同BD结构域结合不同底物的特异性主要受两方面的调节: 一方面, ZA-loop和BC-loop上的非保守残基影响底物特异性; 另一方面, 乙酰化赖氨酸两侧翼的残基也可以和BD结构域结合, 并且BD结构域复合物中的其他亚基也能对其进行特异性调控^[11]。

研究表明, 人BRD2蛋白的BD结构域是一个完整的二聚体, 并且在该处产生的两个乙酰赖氨酸结合囊和带负电荷的结合囊可能是允许BD结构域选择性结合到乙酰化组蛋白4(histone 4, H4)尾部的独特特征^[4]。在完整的细胞核中, BRD2蛋白通过BD结构域与H4乙酰化Lys-12(H4K12ac)结合并激活转录^[12]。BD1结构域突变体(单突变体Y113A、I154A、N156A、P158D和D160A; 双突变体P111D/D112A、D112A/I116E、N156D/D160A和K157A/D160A)与H4K12ac尾肽的特异性结合实验发现, BD1结构域与H4K12ac尾肽的结合均显著降低, 而且I154A突变体的弱结合位于二聚体界面并通过其羰基与H4K8相互作用导致与Lys-8的结合减少, 从而降低了BD1结构域的H4K12ac结合活性。同时, 乙酰化H4K12ac尾中Lys-8的突变(K8A)降低了H4与BD1结构域的结合,

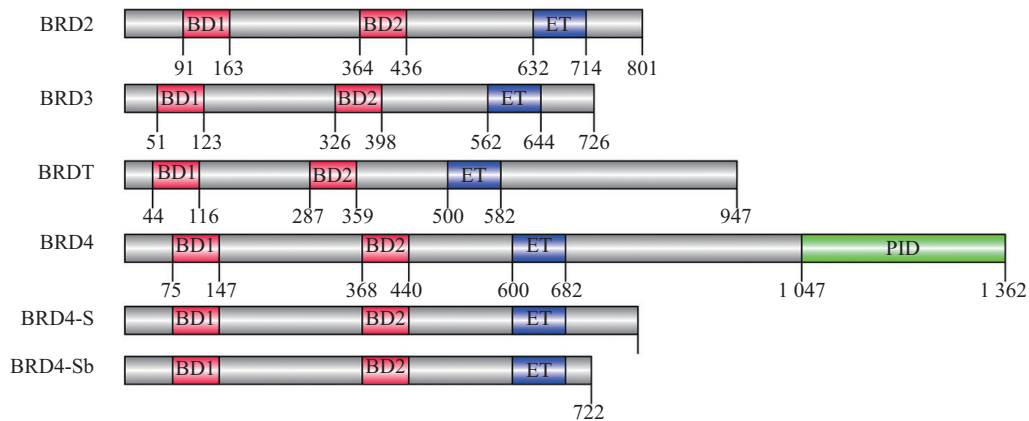
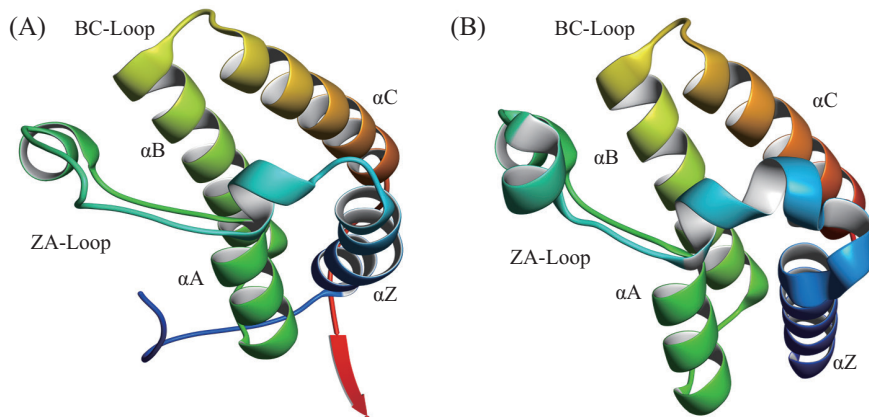


图1 人BET蛋白功能结构域示意图(根据参考文献[8]修改)

Fig.1 Functional domain diagram of human BET protein (modified from the reference [8])



A: 溴结构域1(PDBj登录号: 6ulq); B: 溴结构域2(PDBj登录号: 6u71)。

A: bromodomain 1 (PDBj accession: 6ulq); B: bromodomain 2 (PDBj accession: 6u71).

图2 人BRD2蛋白功能结构域的三级结构图

Fig.2 Tertiary structure of the functional domain of human BRD2 protein

表明Lys-8对BD1结构域识别乙酰化H4K12ac尾肽也很重要^[13]。另外, H4相互作用残基如Tyr-113、Asn-156和Asp-160的突变也进一步降低了BD1结构域与H4K12ac尾肽的结合^[13]。进一步研究发现, 至少10个H4尾残基与BRD2蛋白的BD结构域发生相互作用, 且从BD结构域复合结构推导出的BD结构域的序列氨基酸偏好为XX-K-X-L-X-Kac-XX-A(X应为甘氨酸等柔性残基), 而且该序列在所有的核心组蛋白序列中, 只在H4K12ac附近发现^[13]。此外, 结构研究表明, BD1和BD2结构域优先与二乙酰化肽结合, 且两个氨基酸的最佳间距为Kac-XX-Kac^[14]。虽然BD1结构域倾向于与H4的双乙酰化残基结合, 特别是H4K5ac/H4K8ac, 但BD2结构域具有更多的结合位点, 可以容纳多种不同的双乙酰化肽段^[14]。据报道, 全长BRD2蛋白可以与K5ac/K12ac的H2B结合, 而

BD2结构域以低得多的亲和力结合H4K8ac, 但不能与H2BK5ac或未乙酰化的H4结合, 暗示可能是BD1结构域负责这种相互作用^[15]。这是因为H4K12ac与BD2结构域的结合界面是一个保守的疏水和电子中性空腔, 由五个天冬氨酸残基(D330、D338、D341、D385和D387)形成带负电荷的环^[15]。同时, 由于H4的N末端带正电荷, 当乙酰化赖氨酸侧翼的正电荷残基(Lys-8、Lys-16和Arg-17)突变为负电荷残基时, BD2结构域不再与该肽结合; 而H4K12ac上的另一个侧翼残基Ala-15被甘氨酸取代时, 它以未知的机制诱导BD2结构域的高度聚集^[15]。因此, Ala-15也可能在BD2结构域对H4K12ac的特异性识别中起作用。另外, 当BD2结构域保守残基V329或N382突变为丙氨酸时, BD2结构域在ZA-Loop和BC-Loop环中的构象被破坏, 导致突变株V329A和N382A都不结

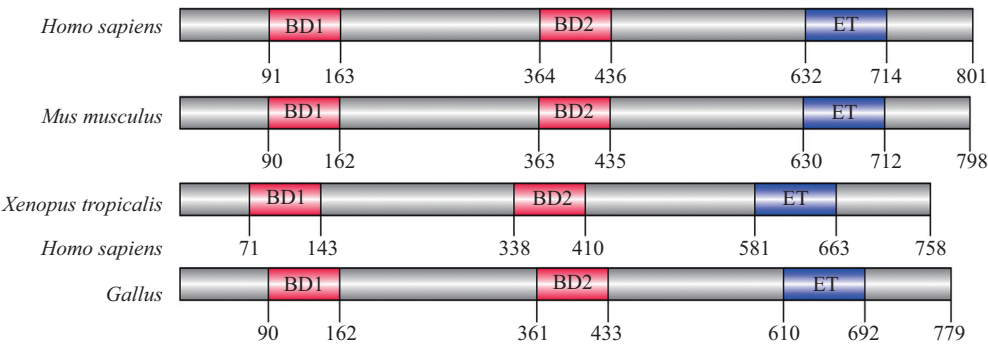


图3 不同物种BRD2蛋白结构示意图

Fig.3 Schematic diagram of BRD2 protein in different species

表1 不同物种BRD2蛋白功能结构域氨基酸位点比较

Table 1 Comparison of the amino acid sites in BRD2 functional domains of different species								
物种 Species	BD1结构域(91~163) BD1 domain (91-163)		BD2结构域(364~436) BD2 domain (364-436)			ET结构域(632~714) ET domain (632-714)		
	138	140	388	399	409	640	643	671
<i>Homo sapiens</i>	A	S	D	V	R	R	S	A
<i>Sus scrofa</i>	A	S	D	V	R	R	S	A
<i>musculus</i>	A	S	D	V	R	R	S	A
<i>Gallus</i>	G	A	E	I	H	K	T	S

合H4K12ac; 而L334A或L336A突变体只是轻微干扰了一些相邻的残基, 很可能不影响结合口袋的构象, 但是与野生型BD2结构域相比, 这两个突变体以低得多的亲和力结合H4K12ac^[15]。因此, 这些高度保守的氨基酸残基对于准确识别配体可能更重要。最近的功能研究表明, BD1结构域在稳态基因表达中具有重要作用, 而炎症刺激诱导的基因表达迅速增加需要BD1和BD2结构域共同发挥作用; 因此BD1结构域抑制剂在肿瘤模型中表现出抑制剂的作用, 而BD2结构域抑制剂在炎症和自身免疫性疾病模型中具有抑制作用^[16]。虽然BD1和BD2结构域都能够特异性识别相同的乙酰化H4尾肽, 但有理由认为它们在BRD2功能中起着独特的作用。在含BRD2的辅激活因子复合物中, BD1结构域可能是二聚体模块, 并与TATA结合蛋白(TATA-box binding protein, TBP)相互作用^[17], 而BD2结构域可能主要用于结合乙酰化组蛋白。因此, BD1和BD2结构域也可能在不同的环境中与乙酰化组蛋白相互作用。

对人和不同动物BRD2蛋白结构特征进行比较发现, 虽然人、哺乳动物、禽类(以鸡为代表)和两栖动物的BRD2蛋白在氨基酸长度上有差别, 但均具有相同的BD和ET结构域(图3)。通过对人、鼠、猪和

鸡BRD2蛋白的BD和ET结构域氨基酸序列进行比对后发现, 鸡BRD2蛋白BD1结构域存在2个氨基酸变异位点, BD2和ET结构域均存在3个氨基酸变异位点, 而人和哺乳动物BRD2蛋白BD和ET结构域氨基酸位点完全一致(表1)。以上结果表明, 人和哺乳动物、禽类之间的BRD2蛋白具有高度保守性, 可能是物种长期进化过程中的一种适应机制, 但禽类BRD2蛋白功能结构域中的氨基酸差异是否会影响其功能仍有待进一步研究。

2 BRD2的细胞功能研究

2.1 BRD2与基因转录调节

一般来说, 组蛋白乙酰化通常导致染色质结构疏松, 使核小体DNA与转录装置的可接触性增加进而激活基因的转录。组蛋白乙酰化主要由三类蛋白质调节: (1) Writers(书写器), 向组蛋白中添加PTMs的酶; (2) Readers(阅读器), 能够识别组蛋白上的特定翻译后标记, 也可以识别标记和组蛋白变体的组合的酶, 主要是含BD结构域蛋白; (3) Erasers(擦除器), 从组蛋白底物中去除特定PTMs的酶^[18]。BD结构域与染色质内核小体相互作用, 对基因转录进行表观遗传调控。同时, BD结构域赋予了BRD2蛋白构

像可塑性,进而允许识别存在于相同或不同的蛋白质中两个不同的乙酰化赖氨酸残基^[13]。因此, BRD2蛋白与组蛋白乙酰化赖氨酸的高选择性结合是识别核小体组蛋白乙酰化、磷酸化、甲基化和其他参与转录调控的一种方式。利用免疫共沉淀技术筛选与人BRD2蛋白相互作用的细胞蛋白,发现互作蛋白可分为三类:染色质相关蛋白、转录激活相关蛋白和细胞周期调节蛋白(表2)^[17]。BRD2蛋白能够结合核小体组蛋白赖氨酸的 ϵ -氨基乙酰基^[19],通过招募RNA pol II、转录起始复合物和SWI/SNF染色质重塑复合物在多个水平上调节转录^[20]。BRD2蛋白还能与

DNA拓扑异构酶II β 结合蛋白1交互检查点和复制调节器蛋白(TOPBP1-interacting checkpoint and replication regulator, TICRR)相互作用调控复制起始^[21]。此外, BRD2蛋白还与DNA双链断裂区结合,调节DNA损伤和修复^[22]。最近研究表明,在小鼠T辅助17细胞(T-helper 17, Th17)分化过程中, BRD2与染色质绝缘子蛋白结合因子(CCCTC-binding factor, CTCF)和黏附素复合体结合,支持基因转录激活的顺式调节增强子组装,并且BRD2以乙酰化敏感的方式与信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)结合,并促进STAT3募集与干

表2 BRD2转录复合物蛋白分类(根据参考文献[17]修改)

Table 2 Classification of proteins in BRD2 transcription complex (modified from the reference [17])

蛋白质名称 Protein name	登录号 Accession	相对分子质量/kDa MW /kDa
Chromatin-related		
Histone H2B	P02278	13.8
Histone H2A	I21992	15.1
Histone H3	I22064	11.3
Histone H4	P02304	11.2
Snf2 β , Brg-1 (brahma)	P51532	184.6
Swi/Snf p155, Brg-1 associated (Baf155)	AAC50693	122.6
Swi/Snf-related chromatin regulator p270	O14497	205.9
Histone deacetylase (HDAC) 11	Q96DB2	39.2
Chromatin assembly factor (CAF) 1, subunit B	Q13112	61.5
Nucleosome assembly protein (NAP) 1-like 3	Q99457	57.5
Nucleosome assembly protein 1, centrosome-associated	NP_009117	281.1
DNA-dependent protein kinase	P78527	468.8
Transcription-associated factors and co-activators		
TATA box binding protein (TBP)	O29874	20.1
TAF _{II} 170 (Snf2 family)	O14981	206.8
TAF _{II} 250	P21675	212.7
TAF _{II} 55	NP_005633	40.3
RNA polymerase β	Q889X7	154.6
E2F-1	JC4929	47.0
DP-1 (E2F binding partner)	Q22703	67.9
Zn finger protein 157 (Kruppel-type C2H2 Zn finger)	P51786	58.2
CREB binding protein (CBP)	NP_004371	265.3
p300	NP_001420	264.2
Homeobox protein Meis1	O00470	45.8
Med6	CAG46498	28.4
Cell cycle regulators		
NimA-related mitotic regulator Nek9	Q8TD19	107.1
Proliferation antigen KI-67	P46013	358.5
BRD2	NP_005095	88.1
Cyclin A2	P20248	48.5

扰素调节因子4(interferon regulatory factor 4, IRF4)结合的活性增强子, 揭示了BRD2在增强Th17细胞发育和获得性免疫所需的遗传程序中的重要功能^[23]。以上结果表明, BRD2蛋白通过与核小体相互作用而募集一些转录相关的蛋白和重塑复合物, 招募RNA pol II、TBP、HAT和HDAC等参与表观遗传修饰, 使不同蛋白在合适的时期发挥作用, 从而调节基因的转录和细胞周期^[24]。

2.2 BRD2与细胞周期

在人和哺乳动物细胞中, 细胞周期素A(Cyclin A)主要通过转录调控来调节细胞周期。Cyclin A具有双重转录抑制机制: 一是E2F转录因子与视网膜母细胞瘤(retino blastoma, RB)家族蛋白的启动子结合形成转录抑制复合物; 二是在细胞周期早期激活与RB蛋白相关的组蛋白去乙酰化酶活性, 这种双重调控维持了Cyclin A位点的转录和沉默, 直到细胞周期进入S期^[25]。3T3成纤维细胞与BRD2蛋白表达载体和含有顺式作用E2F位点的荧光素酶报告载体共转染的实验表明, BRD2蛋白能够刺激转录因子E2F的报告活性, 而乙酰化组蛋白的多肽细胞核提取物能够刺激BRD2蛋白与DNA黏合, 且在HeLa细胞核纯化的E2F转录因子1(E2F transcription factor 1, E2F1)和E2F转录因子2(E2F transcription factor 2, E2F2)的复合物中也存在BRD2^[26]。在血清刺激下, BRD2蛋白转运到成纤维细胞核参与了包括E2F蛋白在内的核蛋白复合物; 并反式激活了依赖E2F的哺乳动物细胞周期基因的启动子, 包括Cyclin A、二氢叶酸还原酶(dihydro folate reductase, DHFR)、细胞周期素D1(Cyclin D1)和细胞周期素E(Cyclin E)^[27]。进一步研究证实, BRD2蛋白在成纤维细胞中的过表达通过增加Cyclin A的表达及其相关的细胞周期蛋白依赖性激酶活性来加速细胞周期^[28]; 并且染色质免疫沉淀研究表明, BRD2蛋白与Cyclin A启动子结合, 它的过表达促进了组蛋白H4的转录活性^[28]。另外, DENIS等^[17]从293T细胞里分离纯化并鉴定了SWI/SNF染色质重构复合物蛋白, 发现BRD2蛋白在其转录复合物中作为一个“支架”蛋白存在。进一步研究表明, BRD2蛋白在E2F1调节细胞周期的进展的过程中表现出蛋白“支架”和转录激活的功能, 并介导E2F1的募集和染色质重塑活性^[20]。因此, 未来的研究将阐明BD结构域蛋白作为一种“支架”的作用, 将染色质重组活动和转录因子招募到细胞周期

基因的启动子上。相关研究发现, 在NIH/3T3细胞内, DHFR基因启动子区域E2F1结合位点的突变, 可以抑制由BRD蛋白增强的转录活性^[26]。在大鼠的高位颈神经节的凋亡诱导期, BRD2蛋白促进Cyclin D1的转录, 提示BRD2蛋白可能是神经元进入凋亡的调控区的激活剂^[29]。此外, 经BET蛋白抑制剂JQ1处理后, E2F1的活性降低, 抑制了人髓母细胞瘤细胞的生长和自我更新, 并诱导细胞凋亡^[30]。以上结果表明, 细胞核内转录因子BRD2与细胞周期之间的联系主要由转录因子E2F依赖的细胞周期基因共同调节。

2.3 BRD2与神经发育

小鼠BRD2基因同族首先被命名为雌性不育同源异型相关基因1(female sterile homeotic-related gene 1, *Fsrg1*), BRD2基因在胚胎发育期间的睾丸、子宫、附睾、卵巢内表达较高, 特别在发育中的脑和中枢神经系统中呈现高表达, 提示BRD2基因可能参与卵泡和神经系统的发育^[31]。采用原位杂交和免疫组织化学方法检测了小鼠BRD2基因在发育的神经组织中的表达, 发现BRD2基因的mRNA在脑小泡、神经管、脊髓和背根神经节中均有表达^[32]。且BRD2基因的mRNA表达高峰在胚胎期第8.5周与12.5周之间, 特别在发育中的神经系统表达更显著^[32]。另外, 虽然BRD2基因在海马和小脑中都有表达, 但BRD2蛋白只在小脑浦肯野细胞中检测到, 而在海马细胞中未检测到^[33]。这是因为BRD2基因能够表达不同的组织特异性转录本, 这些转录本来自不同的启动子, 并且具有不同长度的5'非翻译区(5'untranslated region, 5'UTR); 同时, 体外翻译和培养细胞中的表达发现, 在4种不同的mRNA(长或短5'UTR结合规则剪接和选择性剪接)中, 只有短5'UTR规则剪接的mRNA会产生全长蛋白, 暗示功能性BRD2基因和蛋白的表达会影响神经发育^[33]。因此, BRD2基因敲除的小鼠胚胎只存活到胚胎期第13.5周, 且在妊娠中期显示胚胎发育后的神经管闭合和后脑畸形^[34]。此外, 小鼠胶质细胞内通过BRD2蛋白与NF- κ B信号介导并促进促炎细胞因子的释放来加重神经元损伤^[35]。近年来, 利用关键基因组区域的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)和微卫星标记对人类遗传学进行关联分析, 同样发现, BRD2可能是青少年肌阵挛性癫痫(juvenile myoclonic epilepsy, JME)的主要易感基因^[36]。上述研究表明, BRD2通过调控基因的表达促进了神经元发育, 驱使新生神

神经元细胞类型的增多;另外, BRD2蛋白作为染色质结构和转录的关键整合子, 在哺乳动物胚胎神经发生过程中具有重要作用, 且BRD2基因的异常表达可能导致多个已知基因的错误表达以指导神经元的发育, 致使胚胎性死亡。

2.4 BRD2与细胞炎症和脂肪生成

BRD2基因主要位于哺乳动物MHC中, 参与抗原呈递加工、调控免疫应答、诱导免疫反应和抑制细胞活性等免疫调节过程。研究表明, BRD2基因在哺乳动物体内各组织均有表达, 且在B细胞和T细胞中高表达, 暗示BRD2基因可能参与机体免疫功能的调节^[37]。在小鼠乳腺组织和人类一些肿瘤生长期间BRD2蛋白会增加癌基因的转录活性^[38]。例如, GUO等^[27]发现, 在11q23混合系白血病中, BRD2蛋白可能发挥共同激活急性白血病靶基因的作用。GREENWALD等^[39]发现, 小鼠BRD2蛋白在淋巴的组成性表达增加了*Cyclin A*的转录, 促进了B细胞的增殖并导致B细胞白血病或淋巴瘤发生。CHOI等^[40]发现, 在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激炎症反应后, BRD2 mRNA和蛋白水平升高, 用特异性siRNA敲除BRD2后, 抑制了LPS诱导的小鼠原代星形胶质细胞纤溶酶原激活物抑制物1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)的表达; 且BET蛋白抑制剂JQ1通过抑制BRD2和组蛋白的结合, 以及对PAI-1基因启动子的活性修饰来阻断PAI-1基因的表达。而且在白细胞介素-17A介导的炎症反应中, BRD2能够介导促炎趋化因子IL-8的产生致使角质形成细胞炎症反应^[41]。

BRD2基因在胰岛β细胞中高表达, 通常会抑制胰岛细胞有丝分裂和胰岛素转录, 在3T3-L1前脂肪细胞中, BRD2基因通常协同抑制过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(Peroxisome proliferator-activated receptor-γ, PPARγ)并抑制脂肪生成^[42]。但BRD2基因的敲除保护了3T3-L1脂肪细胞免受肿瘤坏死因子-α(tumour necrosis factor-α, TNF-α)诱导的胰岛素抵抗的影响, 表明小鼠BRD2基因的破坏导致肥胖, 但不会发展成II型糖尿病^[42]。最近的研究还发现, BRD2基因在小鼠白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)中的过度表达显著降低WAT大小且促进血清游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)释放。同时, BRD2在脂肪细胞中的过度表达也会抑制脂肪合成相关基因的表达, 激活激素敏感脂肪酶(hormone sensitive

lipase, HSL)的表达和细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)依赖性磷脂酰肌醇的抑制作用, 并促进甘油的释放^[43]。这表明BRD2也能通过脂解介导的FFA释放触发胰岛素抵抗。

3 BRD2参与病毒复制的研究

逆转录病毒基因组通过病毒整合酶(integrase, IN)整合到宿主的基因组中是病毒复制周期中的必要步骤。稳定整合的前病毒由细胞RNA pol II转录, 促进病毒RNA的合成、翻译和整合到细胞膜上组装的病毒颗粒中, 释放未成熟的病毒颗粒, 使其经历病毒蛋白水解, 产生成熟的病毒颗粒, 引发新一轮感染^[44]。逆转录病毒整合偏好是由将病毒预整合复合体系在染色质上的宿主蛋白决定的。对于人类免疫缺陷病毒1(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1), 晶状体上皮源性生长因子(lens epithelium-derived growth factor, LEDGF/p75)通过C末端区域与HIV-1 IN的直接相互作用, 而其包含PWWP结构域的N末端区域识别染色质中的三甲基化H3尾巴, 从而引导HIV-1整合到活跃转录的基因中^[45]。而γ-逆转录病毒, 如小鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MLV)主要整合位点在增强子、转录起始点(transcription start sites, TSS)、CpG岛和DNaseI超敏位点(DNaseI-hypersensitive sites, DHS)附近^[46-48]。有研究表明, 转录因子、染色质和RNA结合蛋白等细胞蛋白被确定为小鼠白血病病毒整合酶(murine leukemia virus integrase, MLV-IN)的潜在相互作用蛋白, 如BET蛋白能与γ-逆转录病毒IN相互作用, 介导病毒基因组的整合^[49]。SHARMA等^[50]发现, 与HIV-1或禽流感白血病病毒(avian leukosis virus, ALV)相比, MLV更倾向于整合在与BET蛋白相关的启动子附近区域。而且BET蛋白抑制剂JQ1处理可以显著降低TSS的MLV整合频率; 用特异性siRNA同时下调三种BET(BRD2、BRD3和BRD4)蛋白的表达也显著降低了MLV在转录起始点的整合频率^[50]。同时, BET蛋白抑制剂I-BET151和JQ1抑制了MLV在体内的整合, 并使MLV整合位点偏离细胞的TSS^[51]。另外, MLV整合位点的分布与BET蛋白的染色质结合谱平行, BET蛋白的IN结合域与慢病毒靶向因子LEDGF/p75染色质相互作用域的人工融合蛋白能够将MLV整合从转录起始点重新定向到活跃转录的基因体内^[52]。这是因为BRD2蛋白的C末端的ET结构域直接与MLV-IN

相互作用, 将MLV基因组与宿主染色质绑定在一起, 而BRD2作为“染色质阅读器”, 其N末端BD结构域与乙酰化的H3和H4尾部结合, 再将这个复合物定位于TSS和CpG岛促进病毒基因组的复制和表达^[53]。此外, 还有研究证实, MLV-IN的W390A突变能够将整合位点重新分布在远离TSS和CpG岛的位置^[54]。

近年来的研究还发现, BRD2蛋白通过与病毒蛋白的相互作用调控病毒基因和宿主基因的表达水平。在Kaposi肉瘤相关疱疹病毒(kaposi's sarcoma-associated herpes virus, KSHV)潜伏期, KSHV表达一小部分基因, 如在KSHV潜在复制中起着重要作用, 并介导病毒游离体持久性的潜伏期相关核抗原1(latency-associated nuclear antigen 1, LANA-1); BRD2与LANA-1的C末端染色质结合域相互作用将病毒基因组束缚在细胞染色体上, 从而促进KSHV病毒的持久性并参与病毒和细胞基因的转录调节和体外维持^[55-56]。牛乳头瘤病毒1型(bovine papillomavirus 1, BPV-1) E2蛋白依赖其氨基末端反式激活结构域与BRD2同家族成员BRD4相互作用, 将病毒基因束缚在宿主有丝分裂染色体上引起宿主基因的表达变化^[57]。类似研究还发现, BRD2蛋白ET结构域能够与 γ -猪内源性逆转录病毒A/C整合酶(gamma- porcine endogenous retrovirus-A/C integrase, PERV-IN)相互作用介导病毒基因组整合到宿主基因组^[58]。最近研究表明, 无论是BET抑制剂, 还是RNA干扰BRD4表达, 均能广谱抑制新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)、伪狂犬病毒(pseudo rabies virus, PRV)、单纯疱疹病毒1型(herpes simplex virus 1, HSV1)和猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)等。然而抑制BRD4基因的表达并不影响PRRSV基因的转录, 而是抑制了病毒与宿主细胞的吸附^[59]。作者进一步研究发现, 抑制BRD4还能够激活干扰素调节因子3(Interferon-regulated factor 3, IRF3)依赖的抗病毒天然免疫^[59]。本课题组前期通过酵母双杂交发现, BRD2蛋白可能与NDV M蛋白相互作用, 而NDV M在细胞核中抑制宿主基因转录^[60]。进一步研究发现, 鸡BRD2蛋白ET结构域与NDV M蛋白的C末端相互作用, 且小干扰RNA介导的BRD2基因敲除或BRD2基因过表达分别通过上调或下调病毒RNA合成和转录, 显著增强或降低NDV的复制^[61]。以上研究表明, BRD2蛋白作为逆转录病毒感染细胞的辅助因子, 通过ET结构域和与逆转录

病毒IN的相互作用介导逆转录病毒基因组的整合, 而BD结构域主要将该蛋白复合物锚定在组蛋白乙酰化赖氨酸和转录起始位点等促进逆转录病毒基因的表达。如BET蛋白抑制剂可以通过竞争性抑制BD结构域与染色质的相互作用指导逆转录病毒基因的表达, 并且在整合步骤中限制MLV的复制^[50]。另外, 病毒蛋白是否也会通过劫持BRD2/BRD4复合物促进病毒基因的转录也是一个值得深入研究的方向。

4 展望

BRD2作为转录调节因子, 在基因转录调控、细胞增殖、神经细胞生长、脂肪生成和细胞免疫调节方面具有重要作用。通过结合组蛋白和非组蛋白上的乙酰化标记, BD结构域参与染色质重构及基因转录等过程的调控, 将乙酰化赖氨酸信号(尤其是组蛋白上的信号)的解释与转录调控中的一系列反应联系起来, 招募转录复合物调节基因转录, 并控制转录因子。在BET蛋白家族中, BRD3与BRD2的功能相似, 它们具有核小体伴侣活性, 允许RNA pol II通过超乙酰化核小体延长转录物促进转录; BRD4则通过PID结构域招募P-TEFb复合物和RNA pol II, 恢复转录延伸并促进转录; BRDT具有睾丸组织特异性表达, 在精子发生过程中通过与乙酰化组蛋白相互作用发挥染色质重塑因子的功能^[62]。然而在BET蛋白家族中, 仅发现BRD2和BRD4与病毒复制增殖和感染有关, BRD3和BRDT是否存在类似的功能尚不清楚。此外, 研究表明, BD结构域功能异常可导致诸如血癌、乳腺癌、前列腺癌等人类疾病的发生, 而抑制BD结构域的相关活性则被视为疾病治疗的新策略。已有靶向BD结构域的抑制剂, 如JQ1、IBET-151和OTX015等被报道, 能够有效抑制BRD2蛋白介导的肿瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡。最近研究还发现, 靶向BRD2蛋白的BET抑制剂JQ1以药理学剂量依赖的方式发挥了针对DNA病毒的抗病毒活性且降低了RNA病毒的复制。因此, 以BRD2蛋白为药物靶标的深入研究可为将来开展肿瘤治疗和抗病毒感染提供更有力的帮助。

参考文献 (References)

- [1] DHALLUIN C, CARLSON J E, ZENG L, et al. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain [J]. *Nature*, 1999, 399(6735): 491-6.
- [2] CHOUDHARY C, KUMAR C, GNAD F, et al. Lysine acetyla-

- tion targets protein complexes and co-regulates major cellular functions [J]. *Science*, 2009, 325(5942): 834-40.
- [3] FERRIA E, PETOSAB C, MCKENNA C E. Bromodomains: structure, function and pharmacology of inhibition [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, doi: 10.1016/j.bcp.2015.12.005.
 - [4] NAKAMURA Y, UMEHARA T, NAKANO K, et al. Crystal structure of the human BRD2 bromodomain insights into dimerization and recognition of acetylated histone H4 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 282(6): 4193-201.
 - [5] BELKINA A C, DENIS G V. BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(7): 465-77.
 - [6] BECK S, HANSON I, KELLY A, et al. A homologue of the *Drosophila* female sterile homeotic (*fsh*) gene in the class II region of the human MHC [J]. *DNA Seq*, 1992, 2(4): 203-10.
 - [7] PAMBLANCO M, POVEDA A, SENDRA R, et al. Bromodomain factor 1 (Bdf1) protein interacts with histones [J]. *FEBS Lett*, 2001, 496(1): 31-5.
 - [8] YANG C Y, QIN C, BAI L, et al. Small-molecule PROTAC degraders of the bromodomain and extra terminal (BET) proteins—a review [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2019, doi: 10.1016/j.ddtec.2019.04.001.
 - [9] JANG M, MOCHIZUKI K, ZHOU M, et al. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription [J]. *Mol Cell*, 2005, 19(4): 523-34.
 - [10] RAHMAN S, SOWA M E, OTTINGER M, et al. The Brd4 extra-terminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3 [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(13): 2641-52.
 - [11] JACOBSON R H, LADURNER A G, KING D S, et al. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module [J]. *Science*, 2000, 288(5470): 1422-5.
 - [12] KANNO T, KANNO Y, SIEGEL R M, et al. Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells [J]. *Mol Cell*, 2004, 13(1): 33-43.
 - [13] UMEHARA T, NAKAMURA Y, JANG M K, et al. Structural basis for acetylated histone H4 recognition by the human BRD2 bromodomain [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(10): 7610-8.
 - [14] GAMSJAEGER R, WEBB S R, LAMONICA J M, et al. Structural basis and specificity of acetylated transcription factor GATA1 recognition by BET family bromodomain protein Brd3 [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(13): 2632-40.
 - [15] HUANG H, ZHANG J, SHEN W, et al. Solution structure of the second bromodomain of Brd2 and its specific interaction with acetylated histone tails [J]. *BMC Struct Biol*, 2007, doi: 10.1186/1472-6807-7-57.
 - [16] GILAN O, RIOJA I, KNEZEVIC K, et al. Selective targeting of BD1 and BD2 of the BET proteins in cancer and immunoinflammation [J]. *Science*, 2020, 368(6489): 387-94.
 - [17] DENIS G V, MCCOMB M E, FALLER D V, et al. Identification of transcription complexes that contain the double bromodomain protein Brd2 and chromatin remodeling machines [J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(3): 502-11.
 - [18] GILLETTE T G, HILL J A. Readers, Writers, and erasers chromatin as the whiteboard of heart disease [J]. *Circ Res*, 2015, 116(7): 1245-53.
 - [19] LEROY G, RICKARDS R, FLINT S J. The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(1): 51-60.
 - [20] PENG J, WEI DONG L C, ZOU T, et al. Brd2 is a TBP-associated protein and recruits TBP into E2F-1 transcriptional complex in response to serum stimulation [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, doi: 10.1007/s11010-006-9223-6.
 - [21] SANSAM C G, PIETRZAK K, MAJCHRZYCKA B, et al. A mechanism for epigenetic control of DNA replication [J]. *Genes Dev*, 2018, doi: 10.1101/gad.306464.117.
 - [22] GURSOYUZUGULLU O, CARMAN C, PRICE B D. Spatially restricted loading of BRD2 at DNA double-strand breaks protects H4 acetylation domains and promotes DNA repair [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12921.
 - [23] CHEUNG K L, ZHANG F, JAGANATHAN A, et al. Distinct roles of Brd2 and Brd4 in potentiating the transcriptional program for Th17 cell differentiation [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(6): 1068-80.
 - [24] SYLVESTER A, CHEN D, KRASINSKI K, et al. Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(5): 940-8.
 - [25] SIDDIQUI H, SOLOMON D A, GUNAWARDENA R W, et al. Histone deacetylation of RB-responsive promoters: requisite for specific gene repression but dispensable for cell cycle inhibition [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(21): 7719-31.
 - [26] DENIS G V, VAZIRI C, GUO N, et al. RING3 kinase transactivates promoters of cell cycle regulatory genes through E2F [J]. *Cell Growth Differ*, 2000, 11(8): 417-24.
 - [27] GUO N, FALLER D V, DENIS G V. Activation-induced nuclear translocation of RING3 [J]. *J Cell Sci*, 2000, PMID: 10934046.
 - [28] SINHA A, FALLER D V, DENIS G V. Bromodomain analysis of Brd2-dependent transcriptional activation of cyclin A [J]. *Biochem J*, 2005, 387(Pt 1): 257-69.
 - [29] MATANGKASOMBUT O, BURATOWSKI S. Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation [J]. *Mol Cell*, 2003, 11(2): 353-63.
 - [30] VENATARAMAN S, ALIMOVA I, HARRIS P S, et al. Inhibition of BRD4 attenuates tumor cell self-renewal and suppresses stem cell signaling in MYC driven medulloblastoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(9): 2355-71.
 - [31] RHEE K, BRUNORI M, BESSET V, et al. Expression and potential role of Fsr1, a murine bromodomain-containing homologue of the *Drosophila* gene female sterile homeotic [J]. *J Cell Sci*, 1998, 111(23): 3541-50.
 - [32] CROWLEY T E, BRUNORI M, RHEE K, et al. Change in nuclear-cytoplasmic localization of a double-bromodomain protein during proliferation and differentiation of mouse spinal cord and dorsal root ganglia [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004, 149(2): 93-101.
 - [33] SHANG E, CUI Q, WANG X, et al. The bromodomain-containing gene BRD2 is regulated at transcription, splicing, and translation levels [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(10): 2784-93.
 - [34] GYURIS A, DONOVAN D J, SEYMOUR K A, et al. The chromatin-targeting protein Brd2 is required for neural tube closure and embryogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1789(5): 116(7): 1245-53.

- 413-21.
- [35] LIU M, LI Y, GAO S, et al. A novel target to reduce microglial inflammation and neuronal damage after deep hypothermic circulatory arrest [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2020, 159(6): 2431-44.
- [36] GILSOUL M, GRISAR T, DELGADOESCUETA A V, et al. Subtle brain developmental abnormalities in the pathogenesis of juvenile myoclonic epilepsy [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, doi: 10.3389/fncel.2019.00433.
- [37] KIM M, PINTO S M, GETNET D, et al. A draft map of the human proteome [J]. *Nature*, 2014, 509(7502): 575-81.
- [38] LAL A, LASH A E, ALTSCHUL S F, et al. A public database for gene expression in human cancers [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(21): 5403-7.
- [39] GREENWALD R J, TUMANG J R, SINHA A, et al. Eu-BRD2 transgenic mice develop B-cell lymphoma and leukemia [J]. *Blood*, 2004, 103(4): 1475-84.
- [40] CHOI C S, HONG S H, SIM S, et al. The epigenetic reader BRD2 as a specific modulator of PAI-1 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse primary astrocytes [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(11): 2211-9.
- [41] SLIVKA P F, HSIEH C, LIPOVSKY A, et al. Small molecule and pooled CRISPR screens investigating IL17 signaling identify BRD2 as a novel contributor to keratinocyte inflammatory responses [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(5): 857-72.
- [42] WANG F, LIU H, BLANTON W P, et al. Brd2 disruption in mice causes severe obesity without Type 2 diabetes [J]. *Biochem J*, 2009, 425(1): 71-83.
- [43] ZONG J, LI S, WANG Y, et al. Bromodomain-containing protein 2 promotes lipolysis via ERK/HSL signalling pathway in white adipose tissue of mice [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2019, doi: 10.1016/j.ygcen.2019.05.011.
- [44] ENGELMAN A, CHEREPANOV P. Retroviral integrase structure and DNA recombination mechanism [J]. *Microbiol Spectr*, 2014, 2(6): 1-22.
- [45] CHEREPANOV P, MAERTENS G N, PROOST P, et al. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(1): 372-81.
- [46] RAVIN S S D, SU L, THEOBALD N, et al. Enhancers are major targets for murine leukemia virus vector integration [J]. *J Virol*, 2014, 88(8): 4504-13.
- [47] MITCHELL R S, BEITZEL B, SCHRODER A R W, et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(8): 1127-37.
- [48] LAFAVE M C, VARSHNEY G K, GILDEA D, et al. MLV integration site selection is driven by strong enhancers and active promoters [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(7): 4257-69.
- [49] STUDAMIRE B, GOFF S P. Host proteins interacting with the moloney murine leukemia virus integrase: multiple transcriptional regulators and chromatin binding factors [J]. *Retrovirology*, 2008, doi: 10.1186/1742-4690-5-48.
- [50] SHARMA A, LARUE R C, PLUMB M R, et al. BET proteins promote efficient murine leukemia virus integration at transcription start sites [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(29): 12036-41.
- [51] GUPTA S S, MAETZIG T, MAERTENS G N, et al. Bromo- and extraterminal domain chromatin regulators serve as cofactors for murine leukemia virus integration [J]. *J Virol*, 2013, 87(23): 12721-36.
- [52] RIJCK J D, KOGEL C D, DEMEULEMEESTER J, et al. The BET family of proteins targets moloney murine leukemia virus integration near transcription start sites [J]. *Cell Rep*, 2013, 5(4): 886-94.
- [53] ROTH S L, MALANI N, BUSHMAN F D. Gammaretroviral integration into nucleosomal target DNA *in vivo* [J]. *J Virol*, 2011, 85(14): 7393-401.
- [54] ASHKAR S E, LOOVEREN D V, SCHENK F, et al. Engineering next-generation BET-independent MLV vectors for safer gene therapy [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, doi: 10.1016/j.omtn.2017.04.002.
- [55] VIEJO-BORBOLLA A, KATI E, SHELDON J A, et al. A domain in the C-terminal region of latency-associated nuclear antigen 1 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus affects transcriptional activation and binding to nuclear heterochromatin [J]. *J Virol*, 2003, 77(12): 7093-100.
- [56] VIEJOBORBOLLA A, OTTINGER M, BRUNING E, et al. Brd2/RING3 interacts with a chromatin-binding domain in the Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 (LANA-1) that is required for multiple functions of LANA-1 [J]. *J Virol*, 2005, 79(21): 13618-29.
- [57] YOU J, CROYLE J L, NISHIMURA A, et al. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes [J]. *Cell*, 2004, 117(3): 349-60.
- [58] GALLAY K, BLOT G, CHAHPAZOFF M, et al. *In vitro*, *in cellulo* and structural characterizations of the interaction between the integrase of porcine endogenous retrovirus A/C and proteins of the BET family [J]. *Virology*, 2019, 532: 69-81.
- [59] WANG J, LI G L, MING S L, et al. BRD4 inhibition exerts antiviral activity through DNA damage-dependent innate immune responses [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(3): e1008429.
- [60] DUAN Z, XU H, JI X, et al. Importin $\alpha 5$ negatively regulates importin $\beta 1$ -mediated nuclear import of Newcastle disease virus matrix protein and viral replication and pathogenicity in chicken fibroblasts [J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 783-803.
- [61] DUAN Z, HAN Y, ZHOU L, et al. Chicken bromodomain-containing protein 2 interacts with the Newcastle disease virus matrix protein and promotes viral replication [J]. *Vet Res*, 2020, 51(1): 120.
- [62] TANIGUCHI Y. The bromodomain and extra-terminal domain (BET) family: functional anatomy of BET paralogous proteins [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11): 1849-73.