

亨廷顿蛋白相关蛋白 1 与脑源性神经营养因子的胞吞关系的机制研究

陈锴, 肖波, 毕方方, 冯莉

中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘 要:目的 探讨亨廷顿蛋白相关蛋白 1 (HAP1) 与脑源性神经营养因子 (mBDNF) 胞吞的相关性和可能的机制。方法 神经营养因子 (NGF) 诱导分化 PC12 细胞, 将荧光质粒 HAP1A-CFP 和 (或) mBDNF-ds-red 转染进入细胞, 培养 48 h 后在含有 BDNF 或 p75NTR 抗体的培养基中继续培养, 激光共聚焦显微镜观察荧光的表达情况及其在细胞中的定位; 利用小鼠皮层神经元 (正常型和 HAP1 基因敲除型) 在生物素标记 mBDNF 的培养基中孵育 60 min, 激光共聚焦显微镜观察皮层神经元免疫荧光的效果。结果 共转染 HAP1A-CFP 和 mBDNF-ds-red 质粒的细胞, 2 种荧光蛋白存在部分共定位 34%。共转染的细胞在抗 BDNF 培养基孵育下, 或者单转染 HAP1A-CFP 质粒的细胞在 mBDNF-ds-red 荧光蛋白 + 抗 BDNF/抗 p75NTR 培养基孵育下, 2 种荧光蛋白几乎没有共定位现象。单转染 HAP1A-CFP 质粒的细胞在 mBDNF-ds-red 荧光蛋白培养基孵育下, mBDNF 与 HAP1 蛋白的共定位比例高达 93%。正常新生小鼠皮层神经元内可见内吞的 mBDNF 免疫荧光, HAP1 基因敲除小鼠的皮层神经元内未见。结论 mBDNF 的胞吞必需 HAP1 的表达和参与。

关键词: 脑源性神经营养因子; 亨廷顿蛋白相关蛋白 1; 转染; 荧光质粒; 激光共聚焦显微镜

Huntingtin associated protein 1 is involved with the endocytosis of mature brain derived neurotrophic factor

CHEN Si, XIAO Bo, BI Fang-Fang, FENG Li. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: Objective To investigate the roles of Huntingtin associated protein 1 (HAP1) in the endocytosis of mature brain derived neurotrophic factor (mBDNF) and the underlying mechanism. **Methods** PC12 cells were differentiated by NGF and co-transfected with plasmid of HAP1A-CFP and (or) mBDNF-ds-red. The cells were incubated with either recombinant ds-red-labeled mBDNF, or in combination of sheep anti-BDNF antibodies or rabbit anti-p75NTR. The expression of fluorescence and its intercellular location were determined by laser scanning confocal microscope. Cortical neurons from HAP1^{+/+} and HAP1^{-/-} mice at postnatal day 1 were cultured and treated with biotin labeled mBDNF to trigger endocytosis. After 60 minutes, the cells were washed and fixed, followed by immunostaining and confocal imaging. **Results** Co-transfected PC12 cells expressed partly co-localization of HAP1 with mBDNF. Cells transfected with HAP1A-CFP which were incubated with recombinant ds-red-labeled mBDNF showed almost complete co-localization of HAP1 with mBDNF. The antibodies to BDNF and p75NTR abolished co-internalization of HAP1 with mBDNF. In addition, the labeled mBDNF was detected in almost all HAP1^{+/+}, but not in HAP1^{-/-} cortical neurons. **Conclusions** HAP1 plays an important role in the endocytosis of mBDNF.

Key words: mature brain derived neurotrophic factor; Huntingtin associated protein 1; transfection; fluorescence plasmids; confocal microscope

亨廷顿蛋白相关蛋白 1 (Huntingtin associated protein 1, HAP1) 因和亨廷顿病 (Huntington's dis-

ease, HD) 基因产物亨廷顿蛋白 (Huntingtin, Htt) 结合而备受关注^[1]。研究表明, 亨廷顿病人的脑源

收稿日期: 2010-11-16; 修回日期: 2011-01-22

作者简介: 陈锴 (1980-), 女, 博士, 主要从事神经变性、癫痫和脑血管病的研究。

通讯作者: 肖波, E-mail: xiaobo62_xy@yahoo.com.cn。

性神经营养因子 (mature brain derived neurotrophic factor, mBDNF) 的囊泡运输发生障碍, 而且 Htt 和 HAP1 共同参与了 mBDNF 的逆向囊泡运输^[2], 这可能是亨廷顿病的细胞生物学机制之一。mBDNF 是目前的神经营养家族的研究热点, 广泛存在于大脑、脊髓等中枢神经系统^[3], 参与了神经元的生长、增殖、分化和再生。但 HAP1 是否参与 mBDNF 的胞吞, 目前未见相关的文献报道。本研究应用带有青色荧光蛋白基因的质粒 HAP1A-CFP 和红色荧光蛋白基因的质粒 mBDNF-ds-red 转染大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (PC12 细胞), 利用激光共聚焦显微镜观察荧光的表达情况并分析其在细胞中的定位; 利用正常小鼠及 HAP1 基因敲除小鼠的皮层神经元的免疫荧光反应, 进一步阐明 HAP1 是否参与 mBDNF 的胞吞和可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及细胞株 青色荧光融合蛋白质粒 HAP1A-CFP, 红色荧光融合蛋白质粒 mBDNF-ds-red 和 PC12 细胞株获赠于澳大利亚 Flinders 大学 Xin-Fu Zhou 实验室。

1.1.2 动物 HAP1 基因敲除小鼠和正常小鼠获赠于澳大利亚 Flinders 大学 Xin-Fu Zhou 实验室。

1.1.3 主要试剂和材料 DNA 提取试剂盒购于美国 Promega 公司。DMEM 培养基、Neurobasal 培养基、B27、N2、2-ME、谷氨酰胺、青霉素、链霉素、胎牛血清、胰蛋白酶、神经生长因子 (NGF) 购于美国 Gibco 公司。lipofectamine2000 购于美国 Invitrogen 公司。兔抗 p75 受体胞外段单克隆抗体购于美国 Promega 公司。羊抗 BDNF 单克隆抗体、生物素标记 mBDNF、抗 β III-tubulin (神经元标记抗体) 小鼠单克隆抗体、兔抗 HAP1 单克隆抗体获赠于澳大利亚 Flinders 大学 Xin-Fu Zhou 实验室。TCS SP5 型激光共聚焦显微镜购于德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取 从平板培养基中挑选抗性菌落接种至 LB 液体培养基中, 37℃、180 r/min 振荡过夜, 按照 DNA 提取试剂盒操作说明提取质粒 DNA, 利用紫外分光光度法测定质粒浓度。

1.2.2 细胞培养 ①PC12 细胞: 细胞复苏后接种于含有 10% 胎牛血清和双抗的 DMEM 培养基中, 37℃、5% CO₂ 温箱常规培养。②皮层神经元: 选用新生 < 1 d 的正常型和 HAP1 基因敲除型小

鼠, 无菌条件下, 断头、取脑, 分离出双侧大脑皮质, 置于 0.25% 胰蛋白酶消化液中, 在 37℃ 采用机械消化和酶消化相结合的方法, 用细口径滴管吹打数次, 以种植培养液稀释成 1×10^5 /ml 密度, 接种于预先铺有 50 mg/L 多聚赖氨酸的 24 孔板中, 37℃、5% CO₂ 温箱常规培养。细胞培养液为 neurobasal 培养基、2% B27/胎牛血清、1% N2/2-ME、2 mM 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素。

1.2.3 脂质体法转染细胞 转染前 1 d 将 PC12 细胞传代, 取生长状态良好的细胞以 1×10^5 /ml 密度接种于预先铺有多聚赖氨酸的 24 孔培养板, 含 10% 胎牛血清和 50 ng/ml NGF (诱导细胞分化成神经元模型) 的 DMEM 液培养过夜, 待细胞贴壁后进行转染。将 1 μ g 和 (或) mBDNF-ds-red 质粒, 以及 1 μ l 脂质体 Lipofectamine 2000, 分别与 50 μ l 不含血清的无抗生素 DMEM 液混匀, 室温静置 5 min 后, 将 2 种混合物混匀, 室温孵育 20 min, 形成含脂质体-质粒混合物的转染用 DMEM 液 (以上质粒及脂质体量适用于 1 孔)。将培养板中培养基更换为不含血清的 DMEM, 加入转染用 DMEM 液, 37℃、5% CO₂ 温箱常规培养, 2 h 后更换为完全培养基。

1.2.4 制备 mBDNF-ds-red 荧光蛋白 mBDNF-ds-red 质粒转染 PC12 细胞, 48 h 后收集培养上清, 其中含有 mBDNF-ds-red 质粒表达的, 由细胞分泌至培养基中的荧光蛋白。

1.2.5 转染细胞鉴定及激光共聚焦显微镜观察 将转染 48 h 后的 PC12 细胞分为 5 组, 分别在不含血清的 DMEM 培养基中添加不同成分 (见表 1), 37℃、5% CO₂ 温箱常规培养 30 min, PBS 清洗, 4% 甲醛固定 10 min, 室温避光, 封片, 激光共聚焦显微镜观察绿色和红色荧光。对每张细胞片取 10 个不重叠的随机视野, 激光共聚焦显微镜分别报告出两种荧光在细胞内的共定位比率, 进行分析。

1.2.6 皮层神经元免疫荧光及激光共聚焦显微镜观察 将培养的皮层神经元分为正常组和 HAP1 基因敲除组, 将培养基更换为含 1 nM 生物素标记 mBDNF 的 Neurobasal 培养基, 37℃、5% CO₂ 温箱常规培养 60 min; PBS 清洗, 4% 甲醛固定 10 min, 含 0.1% TritonX-100 驴血清封闭 2 h; 一抗 (兔抗 HAP1, 1:1000; β III-tubulin, 1:1500) 4℃ 过夜, PBS 清洗; 二抗荧光素标记 IgG (羊抗兔 IgG/cy3, 羊抗鼠 IgG/cy5, 抗生物素蛋白 avidin/488, 均为 1:

2000) 室温避光 2 h, PBS 清洗, 50% 甘油封片, 激光共聚焦显微镜观察结果。

表 1 5 组 PC12 细胞培养基处理

组别	质粒	培养基中添加成分
1	HAP1A-CFP + BDNF-DsRed	/
2	HAP1A-CFP + BDNF-DsRed	羊抗 BDNF 单克隆抗体
3	HAP1A-CFP	BDNF-DsRed 荧光融合蛋白
4	HAP1A-CFP	BDNF-DsRed 荧光融合蛋白 + 羊抗 BDNF 单克隆抗体
5	HAP1A-CFP	BDNF-DsRed 荧光融合蛋白 + 兔抗 p75NTR 单克隆抗体

2 结果

2.1 PC12 细胞的形态学改变

PC12 细胞呈类圆形, 边界清楚, 胞浆清亮, 生长状态良好, 容易成团。在 NGF 作用下, 细胞停止增殖, 生长出突起, 呈多角型。

2.2 质粒转染细胞和细胞内吞荧光蛋白的效果

转染 HAP1A-CFP 质粒的细胞在激光共聚焦显微镜 405 nm 波长的激光激发下可见青色荧光颗粒; 转染 mBDNF-ds-red 质粒的细胞与内吞 mBDNF-ds-red 荧光蛋白的细胞在 561 nm 波长的激光激发下可见红色荧光颗粒, 荧光颗粒位于胞浆中。

2.3 激光共聚焦显微镜分析两种荧光蛋白在细胞内的共定位比率

共转染 HAP1A-CFP 和 mBDNF-ds-red 质粒的细胞, 激光共聚焦显微镜下可见较多细胞的胞体和突起内发出强烈的青色荧光和红色荧光的蛋白颗粒, 两种荧光蛋白的图片叠加后, 显示部分黄色荧光颗粒, 激光共聚焦显微镜显示 HAP1 与 BDNF 蛋

白的共定位比例为 34% (见图 1-a)。共转染两种质粒的细胞在抗 BDNF 的培养基孵育后, 仍可见胞浆内大量的青色和红色荧光颗粒, 但是 HAP1 与 BDNF 蛋白共定位比率下降仅为 11% (见图 1-b)。转染 HAP1A-CFP 质粒的细胞在 BDNF-ds-red 荧光蛋白的培养基孵育后, 可见胞浆内大量青色和红色荧光颗粒的共定位比率高达 93%, 叠加图片可见大量黄色荧光颗粒 (见图 1-c)。转染 HAP1A-CFP 质粒的细胞在 mBDNF-ds-red 荧光蛋白和 BDNF 抗体的培养基孵育后, 可见胞浆内大量青色荧光颗粒, 几乎未见红色荧光, HAP1 与 BDNF 蛋白共定位比率下降仅有 6% (见图 1-d)。转染 HAP1A-CFP 质粒的细胞在 mBDNF-ds-red 荧光蛋白和 p75NTR 抗体的培养基孵育后, 细胞内几乎无红色荧光颗粒, HAP1 与 BDNF 蛋白的共定位比率仅为 14% (见图 1-e)。激光共聚焦显微镜分析图谱见图 (1-g)。分析比较 5 组 HAP1 与 mBDNF 共定位比例的数据见 (图 1-f)。

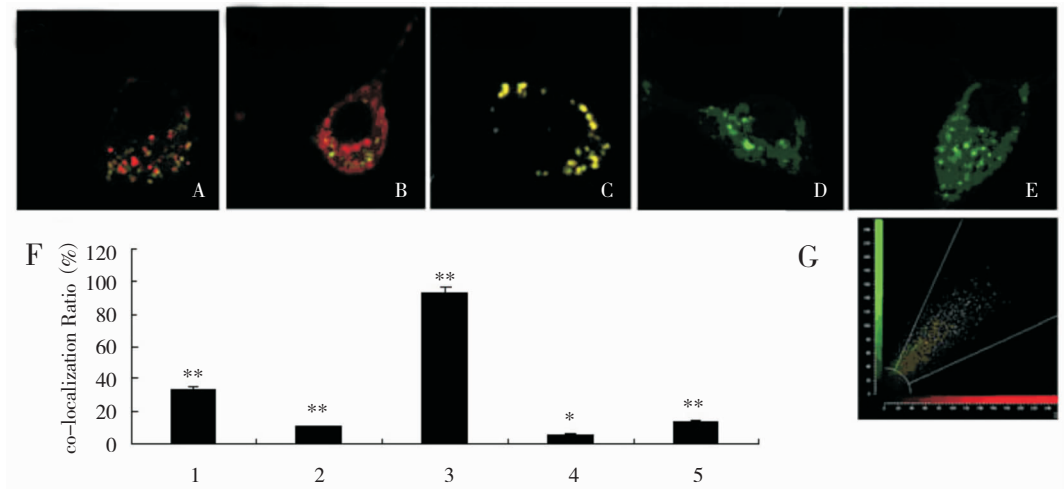


图 1 激光共聚焦显微镜下 HAP1 与 BDNF 的共定位现象。A: 共转染 HAP1A-CFP 和 BDNF-DsRed 质粒的 PC12 细胞; B: 共转染的细胞在含有 BDNF 抗体的培养液孵育后的共定位现象; C: 只转染 HAP1A-CFP 质粒的 PC12 细胞, 在含有 BDNF-DsRed 荧光融合蛋白的培养基孵育后的共定位现象; D: 只转染 HAP1A-CFP 质粒的 PC12 细胞, 在含有 BDNF-DsRed 荧光融合蛋白和 BDNF 抗体后的共定位现象; E: 只转染 HAP1A-CFP 质粒的 P12 细胞, 在含有 BDNF-DsRed 荧光融合蛋白和 p75NTR 抗体的培养基孵育后的共定位现象; F: 五组间比较 HAP1 与 BDNF 的共定位比率 ($n = 20$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); G: 激光共聚焦显微镜分析图谱。

2.4 激光共聚焦显微镜观察皮层神经元免疫荧光的效果

正常新生小鼠的皮层神经元,激光共聚焦显微镜下 488 nm 波长的氩离子激光下可见生物素标记的 mBDNF/488 绿色点状荧光(见图 2-a);在 561 nm 波长的激光激发下可见 HAP1/cy3 红色点状荧光(见图 2-b);叠加图片可见黄色荧光(见图 2-c);在 633 nm 波长的氦氖激光下,β III-tubulin/cy5 发出近红外的蓝色点状荧光(见图 2-f)。HAP1 基因敲除小鼠的皮层神经元,未见绿色和红色荧光(见图 2-d、图 2-e);仅在 633 nm 波长的氦氖激光下发出蓝色点状荧光(见图 2-f)。对每张细胞片取 10 个不重叠的随机视野,激光共聚焦显微镜观察胞吞 mBDNF 的神经元比例(见图 2-g)。

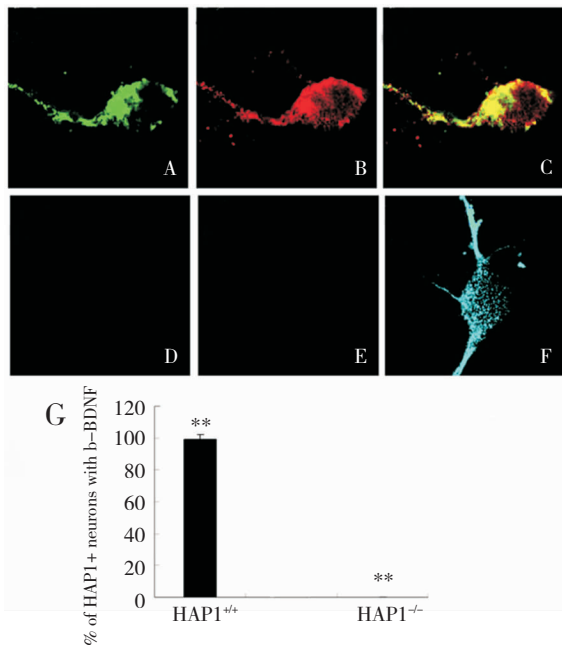


图 2 新生鼠皮层神经元胞吞生物素标记的 BDNF。HAP1^{+/+} 皮层神经元,在激光共聚焦显微镜激发光下发出 (A) 绿色 (BDNF/488)、(B) 红色 (HAP1/Cy3) 和 (C) 叠加图片的黄色点状荧光。HAP1^{-/-} 皮层神经元,在激光共聚焦显微镜下发出 (F) 蓝色 (β III-tubulin/Cy5) 的点状荧光,未见 (E) HAP1 和 (D) BDNF 荧光。G:2 组间比较可见 BDNF 荧光的神经元占可见 HAP1 荧光的神经元总数目的比率, $n = 50$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

HAP1 广泛分布在大脑和脊髓神经元中,作为一种胞浆蛋白,主要定位在神经元的胞浆、轴突终末和树突棘上,电镜观察胞浆内的 HAP1 主要分布在微管以及膜状细胞器中。根据其 C 末端氨基酸序列不同, HAP1 可分为 2 种同工异构型,即

HAP1A 和 HAP1B,其生物学功能大致相同^[1]。有研究提示 HAP1 参与了神经元内物质的运输,与细胞内的分子和细胞器转运以及膜受体的胞吞作用等有关^[2,4]。HAP1 基因敲除小鼠会出现进食障碍,出现新生后早亡^[5]。Gauthier 等^[2]发现 HAP1 参与 mBDNF 的逆向囊泡运输,并且与亨廷顿病 mBDNF 囊泡运输障碍有关。mBDNF 是神经营养因子家族的主要成员之一,是一类调节神经系统发育、成熟、维持神经元(细胞)功能的天然蛋白质^[6,7]。mBDNF 广泛存在于脑内各组织,以大脑皮质、海马、纹状体分布最为丰富,尤其集中在脊髓背侧角的浅层、三叉神经核、孤束核、杏仁体、海马、下丘脑和部分周围组织的神经末梢^[8];mBDNF 是使纹状体神经元存活最重要的因子,病理结果显示,亨廷顿病患者纹状体和大脑皮层的 mBDNF 大量减少。mBDNF 由特定神经元合成后,以囊泡形式储存,然后经活动依赖性方式分泌到胞外;合成的 mBDNF 与轴突末端 p75 神经营养因子受体 (P75NTR) 和酪氨酸激酶 (Trk) 受体相结合^[9,10],启动配体-受体复合体的胞吞,激活一系列胞内信号途径^[11]。但是, mBDNF 的胞吞机制尚不明了。亨廷顿病 mBDNF 是否存在胞吞障碍, HAP1 是否与 mBDNF 胞吞相关,目前未见有相关报道。所以本研究将带有不同荧光蛋白基因的质粒 HAP1A-CFP 和 mBDNF-ds-red 转染 PC12 细胞,应用激光共聚焦显微镜观察不同条件下胞内荧光的表达情况,分析其定位,并且对照正常小鼠与 HAP1 基因敲除小鼠的皮层神经元荧光免疫,寻找 HAP1 与 mBDNF 胞吞相关性的确切证据和可能的机制。本研究观察到转染 HAP1A-CFP 质粒的 PC12 细胞,在含有 BDNF-DsRed 荧光融合蛋白的培养基孵育后, HAP1 与胞吞途径进入细胞的 BDNF 蛋白(外源性 BDNF)的共定位比率高达 93%,提示 HAP1 与外源性 BDNF 蛋白有高度的共定位现象。但是,共转染 HAP1A-CFP 和 BDNF-DsRed 质粒的 PC12 细胞中, HAP1 与 BDNF 这 2 种荧光融合蛋白的共定位比率下降至 34%,笔者认为此时与 HAP1 共区域化的 mBDNF 部分来源于 mBDNF-ds-red 质粒在细胞内的合成表达(内源性 BDNF),部分来源于质粒表达后分泌至胞外的 mBDNF-ds-red 荧光蛋白被细胞内吞形成(外源性 BDNF)。同时,本研究将共转染 HAP1A-CFP 和 BDNF-DsRed 质粒的 PC12 细胞,在含有 BDNF 抗体的培养液孵育后,此时 BDNF-DsRed 质粒表达并分泌至胞外的 BDNF-DsRed 荧光融合蛋白(外源性 BDNF)被抗体中和,发现 HAP1 与细胞内表达的 BDNF 蛋白(内源性 BDNF)几乎没

有共定位现象,共定位比率下降仅为 11%。此外,转染 HAP1A-CFP 质粒的 PC12 细胞,在含有 BDNF-DsRed 荧光融合蛋白和 BDNF 抗体的培养基孵育后,外源性 BDNF-DsRed 蛋白被抗体中和,即阻断外源性 BDNF 的胞吞途径,发现 HAP1 与外源性 BDNF 蛋白共定位比率下降仅为 6%,高度提示 HAP1 与细胞内合成表达的 BDNF 蛋白(内源性 BDNF)几乎没有共定位。研究还发现表达 HAP1A-CFP 荧光蛋白的细胞在 mBDNF-ds-red 荧光蛋白和抗 p75NTR 培养基孵育后(PC12 细胞膜不表达 TrkB 受体),2 种荧光蛋白的共定位比例下降,提示 mBDNF 的转运可能与 p75NTR 受体相关,并且可能也有 HAP1 的参与。

结果表明,HAP1 与经胞吞途径进入细胞的 BDNF 蛋白(外源性 BDNF)有高度的共定位现象,但是与细胞内合成表达的 BDNF 蛋白(内源性 BDNF)几乎没有共定位;同时,BDNF 抗体或者 p75NTR 抗体可以完全阻断 HAP1 与外源性 BDNF 的共定位,说明阻断 p75NTR 介导的胞吞途径后,HAP1 与外源性 BDNF 蛋白的共定位明显下降,提示 BDNF 及其受体 p75NTR 介导的胞吞途径中可能有 HAP1 蛋白的共存,并且这种共存会随着 BDNF 内吞的变化而改变。

同时,在激光共聚焦显微镜下,正常新生小鼠皮层神经元内可见内吞的 mBDNF 免疫荧光,但是 HAP1 基因敲除小鼠的皮层神经元内无 mBDNF 荧光,表明 HAP1^{-/-}型皮层神经元不能胞吞 BDNF 蛋白,证实 HAP1 蛋白的缺失会阻断 BDNF 的胞吞,即皮层神经元胞吞 mBDNF 必需 HAP1 的表达和参与。

本研究结果显示,mBDNF 可存在顺向及逆向转运途径,其胞吞可能与 p75NTR 受体相关,HAP1 参与其胞吞,是其胞吞的关键蛋白,并可能与介导 mBDNF 胞吞的 p75NTR 受体相关。HAP1 是否同 mBDNF 的受体存在直接或间接的结合,相互作用的机制如何,对神经细胞的存活、增殖、迁移和分化的影响如何,是否与 HD 的发病机制有关,其中涉及复杂的细胞生物学机制,将是日后深入探讨的内容。

鸣谢:感谢澳大利亚 Flinders 大学 Xin-Fu Zhou 实验室对本研究的支持和帮助。

参 考 文 献

- [1] Li XJ, Li SH, Sharp AH, et al. A Huntingtin associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature*, 1995, 378(6555): 398-402.
- [2] Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, et al. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 2004, 118(1): 127-138.
- [3] Zhou XF, Song XY, Zhong JH, et al. Distribution and localization of pro-brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the peripheral and central nervous system of the adult rat. *J Neurochem*, 2004, 91(3): 704-715.
- [4] Lin YF, Xu X, Cape A, et al. Huntingtin-associated protein-1 deficiency in orexin-producing neurons impairs neuronal process extension and leads to abnormal behavior in mice. *J Biol Chem*, 2010, 285(21): 15941-15949.
- [5] Chan EY, Nasir J, Gutekunst CA, et al. Targeted disruption of Huntingtin-associated protein-1 (Hap1) results in postnatal death due to depressed feeding behavior. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(8): 945-959.
- [6] Xiao J, Wong AW, Willingham MM, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Promotes Central Nervous System Myelination via a Direct Effect upon Oligodendrocytes. *Neurosignals*, 2011, [Epub ahead of print]
- [7] Rose CR, Blum R, Kafitz KW, et al. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays*, 2004, 26: 1185-1194.
- [8] Zhou XF, Song XY, Zhong JH, et al. Distribution and localization of pro-brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the peripheral and central nervous system of the adult rat. *J Neurochem*, 2004, 91(3): 704-715.
- [9] Deinhardt K, Reversi A, Berninghausen O, et al. Neurotrophins Redirect p75NTR from a clathrin-independent to a clathrin-dependent endocytic pathway coupled to axonal transport. *Traffic*, 2007, 8(12): 1736-1749.
- [10] Kalb R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci*, 2005, 28(1): 5-11.
- [11] Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006, 361(1473): 1545-1564.