

蛋白质精氨酸甲基转移酶的研究进展

陈亚军 综述 文格波 审校

(南 华 大 学 附 属 第 一 医 院 内 分 泌 科 , 湖 南 衡 阳 421001)

[摘要] 蛋白质精氨酸甲基转移酶(protein arginine methyltransferases, PRMTs)是一种在哺乳动物中常见的酶类,负责对蛋白质底物中的精氨酸进行甲基化。精氨酸甲基化是一种广泛的翻译后修饰方式,涉及 RNA 加工、转录调控、信号转导、DNA 修复等多种细胞过程,并参与调节蛋白质与蛋白质之间的相互作用。PRMTs 表达异常与肿瘤、病毒感染、心血管系统疾病等密切相关。

[关键词] 蛋白质精氨酸甲基转移酶(PRMTs); 精氨酸甲基化; 翻译后修饰; 细胞过程

[中图分类号] Q555 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2008)06-0535-05

Progression of protein arginine methyltransferase

CHEN Ya-jun, WEN Ge-bo

(Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang Hunan 421001, China)

[Abstract] Protein arginine methyltransferases (PRMTs) family is familiar in mammalian. The nitrogens of arginine within polypeptides can be posttranslationally modified to contain methyl groups by PRMTs, a process termed arginine methylation. Arginine methylation is a prevalent post-translational modification implicated in a number of different cellular processes, including RNA metabolism, transcriptional regulation, signal transduction and DNA damage repair, it also participate in regulating protein-protein interactions. The deregulated levels of PRMTs may result in cancer, viral pathogenesis, cardiovascular diseases, and so on.

[Key words] protein arginine methyltransferases; arginine methylation; post-translational modification; cellular process

[Int J Pathol Clin Med, 2008,28(6):0535-05]

随着对蛋白质磷酸化研究的逐渐深入,有关精氨酸甲基化的研究也日益引起人们的关注。Paik等^[1]首先从核提取物中发现了精氨酸甲基化产物,而蛋白质精氨酸甲基转移酶(PRMTs)的基因编码蛋白于十年前才得以鉴定。日前,PRMTs 编码基因已经在多种生物体基因组序列中得以鉴定。PRMTs 在生物体中所表达的酶产物靠改变不同的剪接方式在不同的组织中特异表达^[2]。每种 PRMT 都共享一段保守的转甲基酶结构域,这个结构域主要包括能结

合甲基供体的子域、S-腺苷甲硫氨酸(s-adenosylmethionine, AdoMet)和蛋白底物^[3]。

1 PRMTs

在哺乳动物基因组中有超过 1% 的基因编码甲基转移酶^[4]。到目前为止已经鉴定了 9 种哺乳动物的 PRMTs, 并发现其中 7 种酶能催化甲基群从 AdoMet 转移到精氨酸的胍基氮上,产生 S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, AdoHcy)和甲基精氨酸,但尚未证实 PRMT2 和 PRMT8 有此活性。

收稿日期:2008-07-20 修回日期:2008-08-10

作者简介:陈亚军(1980—),女,湖南益阳人,硕士,主要从事内分泌疾病的生理病理学方面的研究。

通讯作者:文格波,E-mail:wengebo@yahoo.com.cn

基金项目:国家自然科学基金(30670993) This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(30670993)

PRMTs 根据其产生的甲基精氨酸的种类不同分为4种主要的类型。I型PRMTs主要包括PRMT1, PRMT3, PRMT4 (CARM1), PRMT6和PRMT8, II型PRMTs主要包括PRMT5, PRMT7和PRMT9 (FBX011)。PRMT7亦显示出III型酶的活性,在某些特定底物存在的情况下能催化单甲基精氨酸 (monomethylated arginine, MMA) 的生成,但不继续催化对称性二甲基精氨酸 (symmetric dimethyl arginines, sDMA) 生成。IV型酶主要是存在于酵母中的Rmt2,这种酶对细胞生长并非首要的,用荧光显微镜观测其在酵母细胞中以颗粒和点状结构聚集^[5],目前在哺乳动物中尚未鉴定有IV型酶的存在。I, II, III型酶催化精氨酸末端(或 ω)的胍基氮原子发生甲基化,IV型酶催化精氨酸的 δ 氮原子发生单甲基化^[6]。I型和II型酶均催化MMA生成,然后I型PRMTs进一步催化非对称性二甲基精氨酸 (asymmetric dimethyl arginines, aDMA) 生成,而II型PRMTs则催化sDMA生成。III型酶催化蛋白质精氨酸残基仅发生单甲基化。PRMT2与PRMT1有极大的相似性,但没有文献报道人类PRMT2具有酶的活性^[6]。最近证实精氨酸甲基化的过程是可逆的,肽基精氨酸脱亚氨酶4型 (peptidylarginine deiminase 4, PAD4)使MMA与瓜氨酸结合并释放出精氨酸,使PRMTs等精氨酸甲基转移酶失去作用位点而达到抑制甲基化反应的目的^[7]。PAD4只能催化单甲基精氨酸,对双甲基化无效。甲基化和脱甲基之间的这种平衡在信号转导途径中的作用还需进一步研究。

2 PRMTs的底物

长期以来认为包括GAR (glycine- and arginine-rich region)共有序列的蛋白质是PRMTs作用的靶标。最近,通过大量的光谱测定法发现越来越多的独立的甲基化位点并不在GAR共有序列。I型酶中的PRMT1, PRMT3和PRMT6通常识别包括GAR共有序列的底物。PRMT3能甲基化含GAR共有序列的底物,也能甲基化与精氨酸相邻的小疏水残基序列。然而PRMT4却表现出更高层次的特异性,只有通过鉴定更多的底物才能详细说明其精确的甲基化共有序列。II型酶中的PRMT5和PRMT7能使GAR共有序列内外的精氨酸均发生甲基化,并且已经鉴定的底物可能偏离GAR共有序列。另外,Cheng等^[8]发现PRMT4和PRMT5还能甲基化PGM

(proline-, glycine-, methionine-)共有序列。随着PRMTs的鉴定和克隆,已知的甲基化蛋白的数量便迅速增加,其中包括髓磷脂碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP)^[9]。此外,通过使用甲基化的GAR特异抗体已经鉴定了超过200种纯化的甲基化蛋白,表明精氨酸甲基化可能是一种广泛的翻译后修饰方式并且涉及很多细胞代谢过程,包括信号转导、转录调控、RNA加工、DNA修复和细胞凋亡等^[10]。精氨酸甲基化是一种高丰度的修饰方式,包含甲基精氨酸的蛋白质同样也是高丰度的蛋白质,如组蛋白、MBP和RNA结合蛋白 (RNA binding proteins, RBPs)等^[9]。

3 精氨酸甲基化调节细胞过程

3.1 RNA代谢过程 RBP在转录后基因调控过程中起重要作用,它通过与RNA相互作用来调节细胞功能。RBPs参与RNA剪接、多聚腺苷化作用、序列编辑、RNA转运、维持RNA的稳定和降解、细胞内定位和翻译控制等RNA代谢的各个方面。大多数的异质性胞核核糖核蛋白 (hnRNPs)包括GAR共有序列而成为PRMTs主要的作用靶标。已经证实许多RBPs中的精氨酸能发生甲基化^[11]。多种RBPs其中包括Sam68在发生低甲基化时均出现错误定位,因此认为精氨酸甲基化可能在这个过程中充当一种成熟的信号,RBPs的甲基化能募集其到成熟的小核糖核蛋白 (snRNPs)周围。从酵母到人类rpS2基因的甲基化均是保守的,并且能影响核糖体的生物合成。位于RBPs活性位点的精氨酸起关键的作用,它能影响RNA与蛋白质的相互作用。精氨酸胍基上的氮通过范德华力与氢连接,特定的RBP与其RNA靶标的亲和力可以负向调节,从而可以肯定精氨酸甲基化能调节RNA与蛋白质之间的相互作用。精氨酸加上甲基后疏水性增加,可能使RNA碱基之间的连接变得更加容易。然而,精氨酸甲基化在多大程度上影响RNA与特异RBPs的结合仍有待鉴定。

3.2 转录调节 早在1967年就发现组蛋白是甲基转移酶的底物,现已确定组蛋白是PRMT1, PRMT4和PRMT5的底物^[11-12]。组蛋白翻译后修饰能调节基因的转录并协助组蛋白编码。P53, YY1 (Yin-Yang-1), NF- κ B等转录因子能协助募集PRMTs到启动子区域^[13]。除组蛋白之外,PRMT5

还能甲基化共激活子 CBP/P300 以及转录延长因子 SPT5, HIV Tat 和 hnRNPs, 并促进 mRNPs 的包装。因此, 精氨酸甲基化能调节转录的起始和延长过程, 并且可能与 mRNPs 的包装和输出同步。

PRMT1 和 PRMT4 双基因敲除可导致许多基因表达异常, 其中包括 CITED2 基因。CITED2 基因的转录活性依赖 STAT5 和 2 种 PRMTs 的共激活作用。芯片分析显示 CITED2 基因是 STAT5, PRMT4 和 PRMT1 直接作用的靶标, STAT5 能与 PRMT4 和 PRMT1 结合, 并且在 2 种 PRMTs 的共同作用下转录增强^[14]。

3.3 信号转导 信号由翻译后修饰所支配, 并且通过改变蛋白质与蛋白质之间的相互作用从而改变蛋白质的生物学功能。精氨酸甲基化对这些相互作用起阻碍或者促进作用。通过 SH3 结构域调节的相互作用对精氨酸甲基化相当灵敏, 而通过 WW (two-tryptophan domain) 和 Tudor 结构域调节的相互作用则增强或未受影响^[15]。在多条途径中, 利用精氨酸甲基化可以作为干扰素受体、T 细胞受体、细胞因子受体和神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 受体信号转导下游的标志。另外, 通过蛋白质生物学分析, 已经鉴定了许多表面受体和信号蛋白^[10]。PRMT1 能结合 I 型干扰素受体的细胞质区域, 从而成为这个家族中与信号转导有关的第一种酶^[16]。活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T-cells, NF-AT) 途径是 PRMT1 作用的靶标, NF-AT 共激活子 NIP45 在 PRMT1 作用下发生甲基化, 精氨酸甲基化使 NIP45 和 NF-AT 更容易结合, 并刺激细胞因子的表达^[17]。PRMT1 能催化 STAT 在 Arg31 上发生非对称性二甲基化^[18], 并且发现精氨酸甲基化能阻止 STAT1 与 PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT1) 的连接^[18], 参与调节 STAT6 的功能, STAT6 Arg27 甲基化的抑制将导致 STAT6 酪氨酸磷酸化作用的减少, 并使 STAT6 不能入核结合 DNA。

3.4 DNA 修复 Boisvert 等^[19]证实 DNA 损伤修复蛋白 MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) 与 ASYM25 (一种特殊 aDMA 抗体) 形成复合物, 提示至少有一种成分包括甲基精氨酸。最近又发现 MRE11 的 GAR 共有序列可以通过 PRMT1 发生精氨酸甲基化^[20]。MRE11 的甲基化不影响 MRE11-RAD50-NBS1 复合物的形成。然而, GAR 共有序列中精氨酸的突变使

MRE11 的核酸外切酶活性丧失, 提示精氨酸甲基化能调节 MRE11 酶的活性, GAR 共有序列通过调节精氨酸甲基化从而调节 MRE11 在信号反应中的活性。

细胞周期停滞是正常细胞遭受 DNA 损伤后的一种普遍特征, 细胞可以通过监视作用修复受损的 DNA 或者终止发育而凋亡。用甲基化抑制剂或 PRMT1 siRNA 处理的细胞在 DNA 损害反应中发生细胞周期检查点的缺失^[20], 提示 PRMTs 在 DNA 损害信号途径中发挥重要作用, 进一步证实 MRE11-RAD50-NBS1 复合物是其底物。

p53 结合蛋白 1 (p53 binding protein 1, 53BP1) 是 DNA 损伤检查点的另一个中央调节者, 它也包含 GAR 共有序列, 并且能与自身 Tudor 结构域相互作用, 推测 53BP1 很可能是 PRMT1 或者 PRMT5 的一种底物。研究发现^[21], 53BP1 Tudor 结构域通过与组蛋白中甲基赖氨酸结合而成为 DNA 损害位点的靶标, 提示 DNA 的损害能诱导 DNA 构象的改变从而导致组蛋白 H3 的第 79 位甲基赖氨酸更容易接近 53BP1, 错误的甲基化能否导致基因的不稳定性则需进一步证实。

4 精氨酸甲基化调节蛋白质与蛋白质之间的相互作用

精氨酸甲基化能正向调节蛋白质与蛋白质之间的相互作用^[11], 如使 GAR 和 PGM 共有序列更易与 Tudor 结构域相互作用。由 PRMT5 催化的 SmB 的对称性二甲基化作用对于它与 SMN, SPF30 和 TDRD3 的 Tudor 结构域相互作用是必需的。PRMT4 催化的 CA150 不对称二甲基化也给 SMN 的 Tudor 结构域提供一个停泊位点。精氨酸甲基化在蛋白质与蛋白质相互作用的过程中也能充当负性调节子。如 Sam68 作为一种衔接蛋白能结合多种包括 SH3 和 WW 结构域的蛋白质。Sam68 邻近脯氨酸基序的精氨酸残基甲基化能阻止其与 SH3 结构域的结合, 而不阻止与 WW 结构域结合^[15]。P300 的 GRIP1 结合区域也受 PRMT4 的调节。组蛋白 H3 在 Lys4 的甲基化为染色体螺旋蛋白 1 (chromo-helicase/ATPase DNA-binding protein 1, CHD1) 的双重染色质域提供停泊位点, PRMT4 能催化组蛋白 H3 Arg2 发生甲基化, 此甲基化与 Lys4 甲基化的共同作用使其与 CHD1 的亲和力较单独 Lys4 甲基化降低 4 倍。

5 精氨酸甲基转移酶与疾病

5.1 肿瘤 前列腺癌和乳腺癌是激素依赖的常见肿瘤。PRMTs 是核受体的共激活子,亦是这些肿瘤中过度表达的候选基因。近年来,研究发现增强表达的 PRMT4 与非雄激素依赖的人类前列腺癌相关^[22]。更为重要的是,抑制 PRMT1 和 PRMT4 同样能抑制雌激素和雄激素受体调节的转录活性。另外,当 PRMT5 过度表达时,可通过抑制肿瘤抑制物的表达,促进非依赖停泊位点的细胞生长,也表明这种酶在改变细胞形态方面是一种反常的候选基因^[12]。虽然尚未能鉴定 PRMTs 是致癌基因或抑癌基因,但已有实验证明在转化过程中赖氨酸甲基转移酶影响蛋白质甲基化。此外,DNA 损伤修复中相关的精氨酸甲基化是肿瘤发生发展的因素之一。在这些肿瘤中,异常的精氨酸甲基化常常导致基因的不稳定性。同样发现某些疾病,特别是白血病和结肠癌,也初步被认为与错误的甲基化有关^[23],因此精氨酸的脱甲基作用为科学家提供一个诱人的药物治疗靶。

5.2 心血管系统疾病 研究表明^[24],参与多种心血管系统调节机制的一氧化氮(NO)在内皮细胞中由内源性一氧化氮合酶(NOS)合成。MMA 和 aDMA 是内源性 NOS 的竞争性抑制剂,可抑制 NO 的合成,使 NO/NOS 通路发生障碍,NO 合成减少,从而导致血管内皮功能障碍而发生动脉粥样硬化^[3]。甲基化蛋白的水解为细胞提供了丰富的精氨酸残基。甲基精氨酸池的大小由二甲基精氨酸二甲基氨基水解酶(dimethylarginine dimethylaminohydrolase, DDAH)控制,它特异水解 MMA 和 aDMA。NOS 对游离甲基精氨酸的抑制受酶的控制,解除抑制可以导致心血管系统疾病。而且 aDMA 水平升高还与高血脂、高血压、糖尿病等动脉粥样硬化的危险因子存在相关关系。

5.3 病毒感染 人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)反式激活蛋白(transactivator protein, Tat)是首先鉴定的包含甲基化精氨酸的 HIV 蛋白,蛋白质精氨酸甲基化的抑制常导致 HIV 基因表达的增强^[6],提示精氨酸甲基化的增加可以协助对抗 HIV 感染。此外,精氨酸甲基化的抑制能阻止丁型病毒性肝炎(hepatitis δ)病毒的复制,提示阻碍甲基化可以为对抗某些病毒提供保护。另

外,STAT1 的精氨酸甲基化通过 JAK-STAT 途径的信号转导在慢性病毒感染中发挥作用。表达完整 C 型肝炎病毒(HCV)阅读框的转基因小鼠和感染慢性 HCV 的病人的肝实质细胞中 IFN- α 基因的表达减少。这条信号途径的缺失是由于蛋白质磷酸酯酶 2A 接触亚基表达水平的增高和 STAT1 Arg31 的低甲基化造成的,提示精氨酸甲基化可能具有抗病毒作用。

5.4 多发性硬化 神经系统对甲基化水平是相当敏感的,叶酸和 VitB12 是合成 AdoMet 产物所必需的,食物中缺乏叶酸和 VitB12 常引起脱髓鞘^[25]。MBPs 包括一个单独的 sDMA,但是与其修饰相关的生理事件和 PRMTs 在体内对它的催化作用仍然是未知的。MBPs 的脱亚氨基和精氨酸甲基化在多发性硬化中增加,提示精氨酸翻译后修饰在这种疾病中的重要性^[25]。发生甲基化的 MBPs 可能充当一种自身抗原,与红斑狼疮中甲基化的 Sm 和环形体蛋白类似。

5.5 脊髓病性肌萎缩 脊髓病性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)是一种常染色体显性遗传病,由于 SMN1 基因的缺失或突变而引起的。RNP 装配需要精氨酸甲基化和 SMN 的参与。事实上,缺乏 SMN 将导致运动神经轴索的失常,提示在运动神经发展过程中 SMN 对于 mRNPs 的集合、转运和翻译是重要的^[2]。最近,SMN Tudor 结构域的点突变已经在 SMA 病人中鉴定,证实 Tudor 结构域是必需的。SMN Tudor 结构域能与甲基化精氨酸结合,并且在 SMA 病人来源的细胞中包含 sDMA 的蛋白质可发生错误定位。

6 展望

精氨酸甲基化的研究尚处于起步阶段,蛋白生物组学和甲基精氨酸抗体技术的运用使甲基化蛋白的数目得到扩增,更多底物的鉴定将挑战公认的 GAR 共有序列,Tudor 结构域和新的结构域将得到鉴定。精氨酸甲基化能调节蛋白质与蛋白质之间的相互作用,并在信号转导过程中充当关键信号蛋白,提示其可能在更多的细胞信号过程中发挥重要作用。另外,PAD4 的具体功能和作用机制需要进一步探讨,异常甲基化与肿瘤和其他疾病的关系也未阐明,随着精氨酸甲基化研究的深入,必将为分子生物学、遗传学和肿瘤学的发展提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Lin WJ, Gary JD, Yang MC, et al. The mammalian immediateearly TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase [J]. *J Chem Biol*, 1996, 271 (25):15034-15044.
- [2] Bedford MT, Richard S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function[J]. *Mol Cell*, 2005, 18 (3):263-272.
- [3] Bachand F. Protein arginine methyltransferases: from unicellular eukaryotes to humans[J]. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(6):889-898.
- [4] Katz JE, Dlakic M, Clarke S. Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(8):525-540.
- [5] Scott HS, Antonarakis SE, Lalioti MD, et al. Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2) [J]. *Genomics*, 1998, 48(3):330-340.
- [6] Niewmierzycka A, Clarke S. S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(2):814-824.
- [7] Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation [J]. *Science*, 2004, 306(5694):279-283.
- [8] Cheng D, Cote J, Shaaban S, et al. The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing[J]. *Mol Cell*, 2007, 25(1):71-83.
- [9] Boisvert FM, Chénard CA, Richard S. Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation[J]. *Sci STKE*, 2005(271):re 2.
- [10] Boisvert FM, Cote J, Boulanger MC, et al. A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(12):1319-1330.
- [11] Herrmann F, Bossert M, Schwander A, et al. Arginine methylation of scaffold attachment factor A by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle-associated PRMT1 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47):48774-48779.
- [12] Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, et al. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(21):9630-9645.
- [13] Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, et al. Role of protein methylation in regulation of transcription[J]. *Endocr Rev*, 2004, 26(2):147-170.
- [14] Kleinschmidt MA, Streubel G, Samans B, et al. The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(10):3202-3213.
- [15] Bedford MT, Frankel A, Yaffe MB, et al. Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW domains[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(21):16030-16036.
- [16] Abramovich C, Yakobson B, Chebath J, et al. A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor[J]. *EMBO J*, 1997, 16(2):260-266.
- [17] Mowen KA, Schurter BT, Fathman JW, et al. Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes[J]. *Mol Cell*, 2004, 15(4):559-571.
- [18] Mowen KA, Tang J, Zhu W, et al. Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription[J]. *Cell*, 2001, 104(5):731-741.
- [19] Boisvert FM, Cote J, Boulanger MC, et al. A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(12):1319-1330.
- [20] Boisvert FM, Déry U, Masson JY, et al. Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(6):671-676.
- [21] Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, et al. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks[J]. *Nature*, 2004, 432(7015):406-411.
- [22] Hong H, Kao C, Jeng MH, et al. Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status[J]. *Cancer*, 2004, 101(1):83-89.
- [23] Shi YJ, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1[J]. *Cell*, 2004, 119(7):941-953.
- [24] Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway; role of asymmetric dimethylarginine [J]. *Circulation*, 2001, 104(21):2569-2575.
- [25] Kim JK, Mastronardi FG, Wood DD, et al. Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic protein in pathogenesis[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(7):2453-2462.