文章编号:1000-5404(2010)15-1605-04

论著

下调 DC-SIGN-ManLAM 结合信号恢复树突状细胞活化初始 T 细胞的能力

李 兰,郭述良,王建军,邬亭亭 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院呼吸内科)

【摘要】 目的 探讨利用 RNAi 下调 DC-SIGN 与 ManLAM 结合信号对树突状细胞(dendritic cells,DCs)活化初始 T 细胞能力的影响。方法 利用筛选出的人 DC-SIGN 分子 RNAi 有效靶点,构建并包装产生慢病毒表达载体。实验分为:干扰组、空载体组和空白对照组。利用慢病毒表达载体下调 DCs 表面 DC-SIGN 分子水平,流式细胞仪、RT-PCR 及 Western blot 检测各组 DCs DC-SIGN 分子水平变化,在 LPS 存在下,与 ManLAM 共培养 18 h 后,流式细胞仪检测 DCs 表面成熟标志物,ELISA 方法检测 DCs 刺激 $CD4^+CD45RA^+$ 初始 T 细胞向 Th1 分化能力,以了解下调 DC-SIGN 与 ManLAM 结合信号对 DCs 活化初始 T 细胞的能力的影响。结果 ①包装慢病毒产生浓缩病毒悬液的滴度为 1×10^9 TU/ml。②流式细胞仪检测干扰组 DCs 表面 DC-SIGN 分子表达水平较其余 2 组显著降低($F=14.19$,$P<0.05$),RT-PCR 检测干扰组 DC-SIGN 目的条带灰度值/内参灰度值(0.252 5±0.139 6)与空白对照组(0.572 2±0.190 9)及空载体组(0.548 7±0.119 3)相比灰度值显著下降($F=8.142$,$P<0.05$),Western blot 检测干扰组 DCs 内 DC-SIGN 蛋白水平均显著低于空载体组和空白对照组($F=51.376$,$P<0.05$)。③干扰组 DCs 的成熟标志物 CD86($F=15.59$,$P=0.004$)、CD83($F=18.03$,$P=0.003$)、HLA-DR($F=7.684$,$P=0.022$)水平较空载体组和空白对照组明显增高。④DCs 与初始 T 细胞共培养,干扰组分泌 IFN-γ($F=18.434$,$P=0.003$)、IL-2($F=31.08$,$P=0.001$)水平较空载体组和空白对照组显著增高。结论 利用 RNAi 慢病毒载体下调 DCs 表面 DC-SIGN 水平,减弱 DC-SIGN 与 ManLAM 结合信号,能够恢复 DCs 的成熟受阻,最终使得 DCs 活化初始 T 细胞的能力恢复。

【关键词】 树突状细胞;DC-SIGN;RNA 干扰;初始 T 淋巴细胞
【中图法分类号】 R392-33;R392.12;R392.2 【文献标志码】 A

Down-regulation of DC-SIGN-ManLAM binding signal recovers ability of dendritic cells to activate naive T lymphocytes

Li Lan, Guo Shuliang, Wang Jianjun, Wu Tingting (Department of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of DC-SIGN-ManLAM binding signal on the ability of dendritic cells (DCs) to activate naive T lymphocytes with RNA interference (RNAi). Methods Effective RNAi targeting human DC-SIGN molecules were used to construct lentivirus vectors. DC were divided into RNAi group, empty carrier group, and blank control group. Changes of DC-SIGN molecules in DC were detected by flow cytometry, RT-PCR and Western blotting, respectively. In the presence of LPS, 18 h after DC and naive T lymphocytes were co-cultured with ManLAM, mature markers of DC were detected by flow cytometry. The effect of DC-SIGN-ManLAM binding signal on the ability of DC to activate naive T lymphocytes toward Th1 differentiation was detected by ELISA. Results The titer of concentrated virus suspension was 1×10^9 TU/ml. The expression level of DC-SIGN on the surface of DC at mRNA and protein levels was significantly lower in RNAi group than in empty carrier group and blank control group. The mature markers of DC including CD86 ($F=15.59$, $P=0.004$), CD83 ($F=18.03$, $P=0.003$), and HLA-DR ($F=7.684$, $P=0.022$) were much more in RNAi group than in empty carrier group and blank control group. The IFN-γ ($F=18.434$, $P=0.003$) and IL-2 ($F=31.08$, $P=0.001$) levels were significantly higher in RNAi group than in empty carrier group and blank control group after DC and naive T lymphocytes were co-cultured. Conclusion Down-regulation of DC-SIGN level with lentivirus vector can weaken the DC-SIGN-ManLAM binding signal, thus recovering the ability of DC to activate naive T lymphocytes.

【Key words】 dendritic cells; DC-SIGN; RNA interference; naive T lymphocytes

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571653) and the Project of Science Research of Chongqing Municipal Health Bureau (05-2-113). Corresponding author: Guo Shuliang, E-mail: guosl999@sina.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30571653);重庆市卫生局科研项目(05-2-113)
【通信作者】 郭述良,E-mail:guosl999@sina.com

树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3-结合非整合素(dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintergrin, DC-SIGN)是树突状细胞(dendritic cells,DCs)表面的一种新型凝集素受体,在调节DCs黏附、迁移,激活初始T淋巴细胞,启动免疫应答,以及病原体的免疫逃逸等多方面发挥重要作用[1-3],是结核病干预策略中的新靶标。在抗结核免疫应答中,只有DCs能够激活初始T细胞。而DCs要发挥活化初始T细胞的作用,其前提是必须成熟[4,5]。但有研究表明结核杆菌胞壁成分——带甘露糖帽的脂阿拉伯甘露聚糖(mannose-capped lipoarabinomannan, ManLAM)能与DC-SIGN分子结合抑制DCs成熟。成熟受阻的DCs不能有效的激活初始T细胞,继而影响$CD4^+$T细胞分化增殖以及巨噬细胞的活化,使机体抗结核免疫应答受到抑制,不能将侵入体内的结核杆菌彻底杀灭,结核杆菌得以存活,并最终发展成为结核病[6]。本研究利用筛选出的人DC-SIGN基因的RNAi有效靶序列,构建并包装产生其RNAi慢病毒载体,以此下调DCs表面的DC-SIGN表达水平,从而下调DC-SIGN与ManLAM的结合信号,减弱ManLAM对DC-SIGN的抑制作用,进而确立DC-SIGN表达水平变化对DCs成熟及下游DCs激活初始T淋巴细胞能力的影响,旨在为后期研究DC-SIGN在结核病发病机制中的作用和基因治疗打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

人外周血标本:新鲜人外周血浓缩白细胞成分购于第三军医大学西南医院输血科,HBsAg阴性,HIV抗体阴性,自愿者均签署知情同意书。

慢病毒包装系统由pGCSIL-GFP、pHelper1.0、pHelper 2.0质粒组成,为上海吉凯公司产品,脂质体2000为Invitrogen公司产品,Ficoll淋巴细胞分离液为天津灏阳生物公司产品,重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF),重组人白细胞介素4(rhIL-4)为Peprotech公司产品,脂多糖(LPS)为Sigma公司产品,荧光标记单克隆抗人抗体PE DC-SIGN、PE CD83、PE-Cy5 CD86、PE-Cy5 HLA-DR以及同型对照PE-Cy5 Mouse IgG2b、PE Mouse IgG1、k、PE Rat IgG2a、FITC Mouse IgG1均为eBioscience公司产品,DC-SIGN引物及内参引物由上海生工合成,RNAiso plus及RT-PCR试剂盒为TaKaRa公司产品,一抗Mouse anti-Flag为Sigma公司产品,二抗Goat Anti-Mouse IgG、内参蛋白Mouse anti-GAPDH均为Santa Cruz公司产品,人INF-γ、IL-2 ELISA检测试剂盒为美国ADI公司产品,$CD4^+$T细胞阴性分选试剂盒为Stemcell公司产品,$CD45Ra^+$免疫磁珠为德国美天旎公司产品,ManLAM由美国科罗拉多州立大学分枝杆菌研究室惠赠。

1.2 方法

1.2.1 siRNA慢病毒载体的构建 从GenBank中查找人DC-SIGN基因序列号(NM_021155),根据其mRNA序列,参考siRNA设计策略,利用Ambion公司的软件,选择4条DC-SIGN基因siRNA序列。通过BLAST同源性分析,排除非特异性抑制其他基因序列的可能。经干扰预实验,筛选有效靶序列,最终确定用于载体构建的siRNA序列为ACGACGACAAATGTAATCT,设计并合成其siRNA的DNA片段,上游:5′-CCGGGAACGACGACAAATGTAATCTTTCAAGAGAAGATTACATGTCGTCGTTCTTTTTG-3′,下游:5′-AATTCAAAAAGAACGACGACAAATGTAATCTTCTCTTGAAAGATTTACATTTGTCGTCGTTC-3′,内含*Age*Ⅰ和*Eco*RⅠ酶切位点。退火形成双链DNA,与*Age*Ⅰ和*Eco*RⅠ双酶切后的线性质粒pGCSIL-GFP连接、转化,挑取重组阳性克隆进行PCR及DNA测序鉴定。PCR鉴定重组克隆的引物:上游5′-CCTATTTCCCATGATTCCTTCATA-3′,下游5′-GTAATACGGTTATCCACGCG-3′;PCR反应循环条件:94 ℃预变性30 s;94 ℃变性30 s;60 ℃退火30 s;72 ℃延伸30 s(第2~4步共30个循环);最后72 ℃延伸6 min。

1.2.2 慢病毒包装及滴度鉴定 慢病毒包装系统包括pGCSIL-GFP载体20 μg,pHelper 1.0载体15 μg,pHelper 2.0载体10 μg。293T细胞作为工具细胞,利用脂质体2000进行转染。转染48 h后收集293T细胞上清液,于4 ℃,4 000 r/min离心10 min,除去细胞碎片,过滤上清液,再次离心,可见病毒颗粒沉淀,弃上清后加灭菌PBS 50~100 μl混匀,分装于EP管中-80 ℃长期保存。逐孔稀释法测定病毒滴度。

1.2.3 慢病毒转染DCs ①DCs的培养与诱导分化:将肝素抗凝的新鲜人外周血浓缩白细胞用PBS对倍稀释,按3∶5的比例将人淋巴细胞分离液和稀释血液成分分别注入离心管内,20 ℃、250×*g*离心20 min,吸取界面层单个核细胞,加入5倍体积的PBS液1 500 r/min离心10 min,弃上清液,PBS重悬,重复上述步骤,以洗尽血小板。用RPMI1640培养基将单个核细胞浓度调至1×10^6/ml,接种于24孔板中,每孔1 ml,37 ℃、5% CO_2贴壁2 h,弃悬浮细胞,获得单核细胞,重新加入完全培养基(含10%胎牛血清的1640)1 ml/孔,每孔加入rhGM-CSF、rhIL-4各50 ng/ml刺激分化,中途不换液。②RNAi慢病毒载体转染DCs培养第4天,用人DC-SIGN RNAi慢病毒载体(病毒滴度为1×10^9TU/ml)转染DCs。慢病毒与DCs共孵育12 h后全量换液,加入等量细胞因子,继续培养60 h后荧光显微镜下观察转染率。同时设立空载体转染组和空白对照组,RNA干扰组及对照组每组均设3个复孔。

1.2.4 慢病毒转染后DCs的DC-SIGN基因检测

1.2.4.1 mRNA水平 采用RT-PCR检测。收集各组细胞,以Trizol抽提细胞总RNA。设计PCR反应引物为DC-SIGN:上游5′-AACAATCCAGGCAAGACG-3′,下游5′-TCCGCTGGGAGTTAGACA-3′,产物大小618 bp。β-actin:上游5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′,下游5′-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3′,产物大小272 bp。PCR反应条件为94 ℃预变性5 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共30个循环,72 ℃终末延伸5 min后4 ℃保存。最后PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳显示,用Quantity One软件测定各个条带灰度值。

1.2.4.2 蛋白水平 采用蛋白质印迹方法检测。一抗为1∶2 500稀释的鼠DC-SIGN单抗,二抗为1∶5 000稀释的辣根

过氧化物酶标记的 IgG，内参使用 β-actin。结果用凝胶电泳图像扫描仪进行凝胶图像扫描，进行图像分析，用相对灰度值表示蛋白相对含量。

1.2.5　流式细胞仪检测 DCs 表型　　于培养第 7 天的各组细胞中，分别加入 LPS 1 μg/ml，ManLAM 15 μg/ml 共培养，18 h 后收集部分细胞，FACSCalibur 流式细胞仪检 DC-SIGN、CD86、CD83、HLA-DR。每个样本都用荧光标记同型对照作为阴性对照。

1.2.6　初始 $CD4^+CD45RA^+$ T 淋巴细胞的分离纯化及激活

①$CD4^+$ T 细胞阴性分选试剂盒分选 $CD4^+$ T 细胞：取 10 ml 全血，加入富集人 $CD4^+$ T 细胞试剂 500 μl，混匀后分管加到含 5 ml 淋巴细胞分离液的离心管中，经密度梯度离心后（2 000 r/min，15 min），吸取 $CD4^+$ T 细胞层调整细胞浓度 2×10^6/ml 备用。$CD45RA^+$ 免疫磁珠阳性分选初始 $CD4^+$ T 淋巴细胞：取 1 ml $CD4^+$ T 细胞，与抗 $CD45RA^+$ 免疫磁珠共孵育，在磁力架上经免疫磁珠分选柱过滤，用 PBS（含 2% 胎牛血清）冲洗后，取下分选柱消磁，用 RPMI1640（含 10% 胎牛血清）冲洗分选柱，得到 $CD4^+CD45RA^+$ T 细胞调整细胞浓度 4×10^6/ml。②将分离纯化的初始 T 淋巴细胞加入上述继续培养的 DCs（初始 T: DCs = 4: 1），共培养 48 h 后收集各组细胞上清液，ELASA 检测 IFN-γ、IL-2 水平变化。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件，多组计量资料均数比较行单因素方差分析，组间两两比较行 SNK-q 检验。

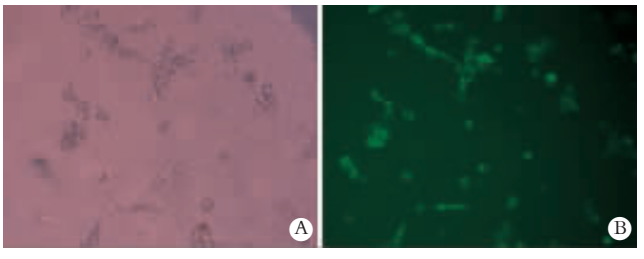
2　结果

2.1　慢病毒表达载体包装及滴度测定

设计合成筛选确定的有效靶序列的 Oligo DNA，退火形成双链 DNA，与 pGCSIL-GFP 载体连接产生 DC-SIGN 慢病毒载体，进行 PCR 及测序鉴定。用 pGCSIL-GFP、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体共转染 293T 细胞，包装产生慢病毒，24 h 后在荧光显微镜下可观察到 293T 细胞中表达绿色荧光，证实了 GFP 基因的表达。用系列稀释法测定的病毒滴度为 1×10^9 TU/ml。

2.2　慢病毒转染 DCs 后荧光显微镜观察

实验证实，人原代 DCs 最佳转染时机为培养第 4 天，最适 MOI 值为 20，感染时间以 12 h 为宜。转染 72 h 后荧光显微镜下可见约有 85% 的细胞表达绿色荧光，即转染率约为 85%。见图 1。

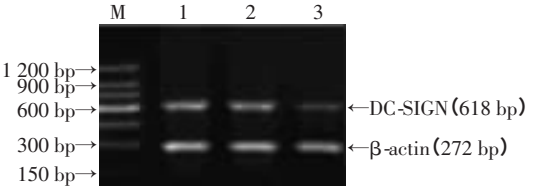


A：可见光视野（倒置相差显微镜）；B：绿色荧光视野（荧光显微镜）

图 1　转染人 DC-SIGN RNAi 慢病毒表达载体 72 h 后 DCs 的形态观察　（×200）

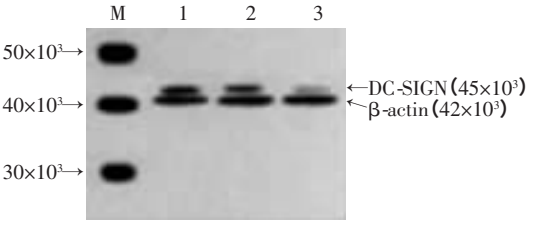
2.3　人 DC-SIGN RNAi 慢病毒转染对靶基因和蛋白的影响

在慢病毒转染原代培养的 DCs 72 h 后，分别提取细胞的总 RNA 和总蛋白。RT-PCR 的结果显示干扰组 DCs 细胞的 DC-SIGN 基因 mRNA 水平受到了明显抑制（图 2），RNA 干扰组目的条带灰度值/内参灰度值（0.252 5 ± 0.139 6）与空白对照组（0.572 2 ± 0.190 9）及空载体组（0.548 7 ± 0.119 3）相比灰度值显著下降（$F=8.142$，$P<0.05$）；Western blot 检测结果显示干扰组蛋白水平也明显降低（图 3），干扰组目的条带灰度值/内参灰度值（0.324 ± 0.057），与空白对照组（0.590 ± 0.014）及空载体组（0.578 ± 0.023）相比灰度值显著下调（$F=51.376$，$P<0.05$）。两者结果一致表明，人 DC-SIGN RNAi 慢病毒有效下调了 DC-SIGN 基因及蛋白水平。



M：标准；1：空白对照组；2：空载体组；3：干扰组

图 2　RT-PCR 检测各组 DC-SIGN mRNA 的表达

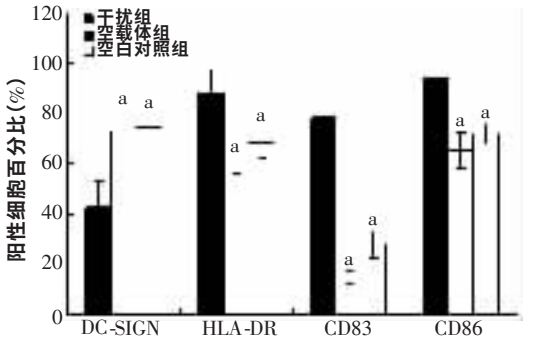


M：标准；1：空白对照组；2：空载体组；3：干扰组

图 3　Western blot 检测各组 DC-SIGN 蛋白的表达

2.4　流式细胞仪检测各组 DCs 表型

干扰组 DC-SIGN 分子表达水平较其余两组显著降低（$F=14.19$，$P<0.05$）；干扰组 DCs 的成熟标志物 CD86（$F=15.59$，$P=0.004$）、CD83（$F=18.03$，$P=0.003$）、HLA-DR（$F=7.684$，$P=0.022$）水平均较其余两组明显增高。见图 4。



a：$P<0.05$，与干扰组比较

图 4　流式细胞仪检测各组 DCs 表型（$n=3$）

2.5　ELISA 检测初始 $CD4^+$ T 淋巴细胞活化

结果显示，干扰组分泌 IFN-γ 水平（881.8 ± 133.4）pg/ml 较空载体组（507.0 ± 98.5）pg/ml 和空白对照组（436.3 ±

22.3) pg/ml 显著增高($F=18.434$, $P=0.003$)。空载体组分泌 IFN-γ 水平高于空白对照组,但差异无统计学意义($P=0.404$)。干扰组分泌 IL-2 水平(372.8±41.7) pg/ml 较空载体组(185.6±24.1) pg/ml 和空白对照组(211.3±25.7) pg/ml 显著增高($F=31.08$, $P=0.001$)。空载体组分泌 IL-2 水平低于空白对照组,但差异无统计学意义($P=0.356$)。

3 讨论

目前用于 RNAi 的主要有质粒载体和病毒载体两类,但质粒载体转染哺乳动物细胞的效率不如病毒载体,尤其无法转染非分裂象细胞。目前国内尚无人 DCs 细胞系,而在原代培养的人 DCs 中无法使用常见的脂质体等转染工具。慢病毒载体免疫原性低,能感染分裂象及非分裂象细胞,能将自身携带的干扰片段整合入宿主基因组,是一个能够在原代人 DCs 中进行 RNAi 的有效工具[7,8]。

在体内,位于外周的未成熟 DCs 识别并捕获结核杆菌后向次级淋巴器官迁移,在迁移过程中受某些抗原如脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)等刺激逐渐成熟,提呈抗原,活化初始 T 细胞,启动机体抗结核免疫应答。但是有研究表明[4,9],ManLAM 与 DC-SIGN 结合后,可经信号交流,干扰 LPS 作用于 DCs 的 TLR4 和/或 TLR2 信号途径[10],从而显著抑制 LPS 所诱导的 DCs 成熟。本研究构建人 DC-SIGN 分子 RNAi 慢病毒载体,并在体外细胞水平下调 DCs 表面 DC-SIGN 表达水平,减弱 ManLAM 对 DC-SIGN 的抑制信号,从而使得 ManLAM 对 DCs 的成熟受阻得到恢复,流式细胞仪检测到干扰组 DCs 的成熟标志物 CD86、CD83、HLA-DR 较其余两组显著增高,空载体组和空白对照组 DCs 成熟度有所降低。

传统的鉴别初始 T 细胞的方法是根据 CD45RA 表达与否,CD45RA(+)者为初始 T 细胞。其接受抗原刺激后,可分化为 Th1 或 Th2 细胞,而在抗结核免疫应答研究中,初始 T 细胞在成熟 DCs 的激活作用下主要向 Th1 方向分化,同时会分泌较多 IFN-γ、IL-2 等细胞因子[11-13]。激活后的效应性 $CD4^+$ T 淋巴细胞分泌的 IFN-γ 和 IL-2 是控制结核感染的主要细胞因子。它们可以激活巨噬细胞,增强巨噬细胞抗原提呈及杀菌功能,发挥抗结核作用。我们利用免疫磁珠分离得到初始 T 细胞,与成熟度不同的各组 DCs 细胞共培养,刺激其向 Th1 方向分化,结果显示干扰组分泌的 IFN-γ、IL-2 水平均显著高于其余两组,提示下调 DC-SIGM 与 ManLAM 的结合信号,恢复了 ManLAM 对 DCs 的成熟受阻,最终也恢复了抗结核免疫应答中 DCs 对初始 T 细胞的活化能力。

本研究表明,人 DC-SIGN RNAi 慢病毒表达载体可在体外细胞水平有效抑制 DC-SIGN 基因表达,下调 DCs 表面 DC-SIGN 表达水平,减弱 ManLAM 对 DC-SIGN 的抑制信号,进而恢复了 DCs 的成熟受阻,最终使得 DCs 活化初始 T 淋巴细胞的能力恢复。这为我们后续研究人 DC-SIGN 分子水平调控对下游抗结核免疫应答功能的影响奠定了基础,对进一步明确人 DC-SIGN 分子在结核病发病机制中的作用也有帮助,为结核病以及其他相关疾病的预防和治疗提供了新思路。

参考文献:

[1] Torrelles J B, Azad A K, Henning L N, *et al*. Role of C-type lectins in mycobacterial infections[J]. Curr Drug Targets, 2008, 9(2): 102-112.

[2] Feinberg H, Guo Y, Mitchell D A, *et al*. Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR[J]. J Biol Chem, 2005, 280(2): 1327-1335.

[3] Venkatachari N J, Alber S, Watkins S C, *et al*. HIV-1 infection of DC: evidence for the acquisition of virus particles from infected T cells by antigen uptake mechanism[J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7470.

[4] Maeda N, Nigou J, Herrmann J L, *et al*. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan[J]. J Biol Chem, 2003, 278(8): 5513-5516.

[5] 刘平, 郭述良, 罗永艾. DC-SIGN 分子与结核病的发生[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(6): 458-461.

[6] Geijtenbeek T B, van-Vliet S J, Koppel E A, *et al*. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function[J]. J Exp Med, 2003, 197(1): 7-17.

[7] Reynolds A, Leake D, Boese Q, *et al*. Rational siRNA design for RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(3): 326-330.

[8] 杨馨, 胡应和. 慢病毒载体介导的 RNA 干扰[J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28(4): 497-500.

[9] Dulphy N, Herrmann J L, Nigou J, *et al*. Intermediate maturation of Mycobacterium tuberculosis LAM-activated human dendritic cells[J]. Cell Microbiol, 2007, 9(6): 1412-1425.

[10] Gringhuis S I, den-Dunnen J, Litjens M, *et al*. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling *via* Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcriPtion factor NF-kappaB[J]. Immunity, 2007, 26(5): 605-616.

[11] Geijtenbeek T B, den-Dunnen J, Gringhuis S I. Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaPtive immunity[J]. Future Microbiol, 2009, 4: 879-890.

[12] Zenaro E, Donini M, Dusi S. Induction of Th1/Th17 immune response by Mycobacterium tuberculosis: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN[J]. J Leukoc Biol, 2009, 86(6): 1393-1401.

[13] 张慧洁, 陈兰举, 陈名武. T 淋巴细胞亚群在结核感染免疫反应中的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(19): 1342-1343.

(收稿 2010-03-16 修回 2010-05-05)

(编辑 汪勤俭)