

Gp78/ Bip 介导戊型肝炎病毒衣壳蛋白对宿主细胞的吸附

吴小成 苗季 郑子峥 何水珍 孙媛媛 唐明 张军 夏宁邵

【摘要】 目的 探讨 Gp78/ Bip 在戊型肝炎病毒(HEV)衣壳蛋白进入宿主细胞过程中的作用。方法 采用 pull-down 和免疫共沉淀技术进一步验证 p239 与 Gp78/ Bip 的相互作用;采用激光共聚焦显微镜技术检测 p239 与细胞膜表面 Gp78/ Bip 共定位情况;采用原核表达纯化的 Gp78/ Bip 蛋白封闭 p239 的 Gp78/ Bip 结合位点,检测其阻断 p239 吸附细胞的效果。结果 p239 与 Gp78/ Bip 可以直接结合,而且这种结合是可逆的生理性结合;p239 与 Gp78/ Bip 在细胞膜上存在部分共定位;Gp78/ Bip 能部分阻断 p239 对肝细胞的吸附。结论 Gp78/ Bip 参与并介导 HEV 衣壳蛋白对宿主细胞的吸附。

【关键词】 戊型肝炎病毒; 衣壳; Gp78/ Bip; 病毒吸附

Gp78/ Bip facilitates the attachment/ entry of the hepatitis E virus capsid protein to host cells

WU Xiaocheng, MIAO Ji, ZHENG Zizheng, HE Shuizhen, SUN Yuaruan, TANG Ming, ZHANG Jun, XIA Ningshao (National Institute of Diagnostics and Vaccine Development for Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen Fujian 361005, China)

【Abstract】 Objective To further investigate the interaction between recombinant hepatitis E virus (HEV) capsid protein p239 and Gp78/ Bip and the role of Gp78/ Bip in HEV penetration. **Methods** We utilized pull-down, immunoprecipitation and antibody blocking assays to examine the interaction between p239 and Gp78/ Bip. Confocal microscopy was used to investigate the co-localization of these two proteins. Purified Gp78/ Bip was used to block the attachment of p239 to host cells. **Results** p239 directly bound to Gp78/ Bip and this binding was sensitive to ATP. Furthermore, antibody blocking results demonstrate that this interaction was indeed conformation-dependent. A partial co-localization of p239 and Gp/ Bip was observed on the plasma membrane of HepG2 by confocal microscopy. Pre-incubation of Gp78/ Bip with p239 significantly blocked the attachment of p239 to HepG2 cells. **Conclusion** Gp78/ Bip participates in the attachment and/ or entry of the HEV capsid protein to host cells. These results further contribute to the understanding of the entry mechanism of the hepatitis E virus after infection.

【Key words】 Hepatitis E virus; Capsid; Gp78/ Bip; Virus attachment

戊型肝炎是由戊型肝炎病毒(HEV)感染引起的急性肝炎,症状与甲型肝炎相似,但病死率较高^[1,2]。随着甲型肝炎疫苗的普遍接种,HEV 感染导致的急性肝炎问题日显突出,我国近年戊型肝炎发病率增长迅速,已经成为危害严重的疾病之一^[3]。此外,研究表明人类在食用未经充分烹饪的动物内脏和肌肉后可以感染 HEV^[4]。因此,戊型肝炎已被归类为人畜共患病^[4,5],已经严重威胁到人类的身体健康。HEV 基因组为全长 7.2 knt 的单股正链 RNA,分为 3 个开放阅读框架(ORF):ORF1 编码病毒复制与组装相关的各种酶,ORF2 编码病毒衣壳蛋白,而 ORF3 可能参与了 HEV 在细胞内的转运^[6]。病毒成功感染的第 1 步是病毒与细胞膜表面的吸附。这种表面吸附可以分为两类,即病毒颗粒与黏

附因子之间的非特异性吸附以及与病毒受体之间的特异性吸附。病毒受体通过这种特异的相互作用诱导病毒颗粒构象改变,激活胞内各种信号转导途径,启动内化程序,主动完成病毒的侵入过程。Gp78 作为 HSP70 热休克蛋白家族中的一员,主要参与蛋白质在内质网的加工、折叠,包括某些病毒在胞内的组装、成熟与转运^[7]。最近有研究表明,Gp78 也存在于细胞膜表面,特异性介导一些蛋白向胞内转运,即承担细胞表面受体的功能^[8]。HEV 本身极易降解,很难获得大量纯化病毒,野生 HEV 可以微量感染 HepG2、Huh7 等细胞,但仅维持数日^[9,10]。由于 HEV 缺乏合适的细胞培养模型,极大地限制了 HEV 感染宿主细胞机制的研究,迄今尚无有关受体研究等方面的报道。

本实验室对 HEV ORF2 衣壳蛋白进行了大量的研究,证实所表达的 p239 蛋白可以很好地模拟病毒表面结构^[11,12]。前期研究同时揭示 p239 可以吸附、进入 HepG2 细胞并有效阻断野生 HEV 对 HepG2 和原代培养肝细胞的感染^[12,13]。上述研究证实了

基金项目:1 福建省科技重大专项(2004y201);2 福建省青年科技人才创新项目(2006F3124)

作者单位:厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 福建厦门 361005

通讯作者:夏宁邵, E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

p239 含有和 HEV 相同的细胞结合表位。以此为基础,我们筛选了 p239 在肝细胞中的结合蛋白,发现 p239 与热休克蛋白家族蛋白 Gp78/Bip (Gp78) 有相互作用^[14]。本研究利用 pull-down 等方法,进一步研究了两者的相互作用,为 HEV 感染机制的研究提供了线索。

材料和方法

1. 实验材料及细胞培养 HEV 单克隆抗体 16D7、15B2 和 8C11 由本实验室制备。重组颗粒性 HEV ORF2 蛋白 p239 由本实验室生产。p233 蛋白由 p239 改造而成,在 C 端缺失 6 个氨基酸并产生构象改变,因而不能与中和单克隆抗体 8C11 反应。HepG2 细胞购自 ATCC,37 培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,隔天消化传代。

2. pull-down 实验 Gp78 基因聚合酶链反应 (PCR) 扩增后^[14],以 BamH / Hind 位点接入 pET-30a(+),转化 ER2566, IPTG 诱导表达。经过硫酸铵沉淀,金属亲和层析得到纯化的 Gp78-his 蛋白。Gp78-his 与 15 μl Ni-Agarose 于 4 结合 1 h,洗去未结合的蛋白,加入 3 μg p239 于 1 ml PBS 体系 4 反应 2 h,100 mmol/L 咪唑洗脱,制样分析。p233 与 Gp78 反应实验以及 8C11 阻断 p239 与 Gp78 实验均以此实验为基础,将 p239 换成 p233 或是在 p239 与 Gp78 反应前,将 HEV 中和单克隆抗体 8C11 以 1 mg/ml 的浓度与 p239 先于 4 反应 30 min,然后加入结合有 Gp78-his 的 Ni-Agarose 共孵育。

3. 免疫共沉淀 1 ml 20 mmol/L PB pH 8.0 体系中加入 20 μg 原核表达、纯化的 Gp78,6 μg p239,4 孵育 1 h,然后与 10 μg 的 16D7 或阴性对照抗体,15 μl 的 ProteinA/G Agarose,4 孵育 2 h,20 mmol/L PB pH 8.0 缓冲液或 5 mmol/L ATP (20 mmol/L PB pH 8.0) 缓冲液洗涤,挂柱产物煮沸,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离、转膜后用兔抗 Gp78 多克隆抗体 (Santa Cruz, 1:1000) 检测。

4. 间接免疫荧光 1 × 10⁵ HepG2 细胞培养于预先放置盖玻片的 24 孔板中。2 μg 的 pcDNA3.1-HA-Gp78 质粒用 so-fast 脂质体转染 (梭华, 5 μl), 24 h 后加入 p239, 于 4 孵育 30 min。细胞经 PBS 漂洗后,用 4% 多聚甲醛固定,然后与本室制备的 HEV 单克隆抗体 16D7 (1:500) 及抗 Gp78 兔多克隆抗体 (Santa Cruz, 1:100) 室温孵育 1 h,再与异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗鼠 (Sigma, 1:500) 及 TRITC 标记的

羊抗兔 (Sigma, 1:500) 室温孵育 30 min。封片后荧光信号由 Leica 激光共聚焦显微镜扫描分析。

5. Gp78 蛋白阻断 p239 吸附实验 100 μl PBS 体系中加入 20 μg Gp78, 3 μg p239, 4 反应 1 h,然后与 24 孔板中的 HepG2 细胞 (1 × 10⁵) 室温孵育 30 min,弃培养上清液, PBS 洗涤 3 次,收集细胞,加入上样缓冲液煮沸,经 SDS-PAGE 后蛋白印迹法检测。

结果

1. HEVp239 与 Gp78 的相互作用 我们曾采用亲和层析技术在 HepG2 细胞中分离出与 HEV 衣壳蛋白 p239 结合的蛋白 Gp78/Bip, 并利用免疫沉淀初步验证了两者的相互作用^[14]。在本实验中,我们将 Gp78 基因克隆到含 his 的原核表达载体,表达并纯化出 Gp78-his 融合蛋白 (结果未附)。采用 pull-down 技术,首先将 Gp78-his 及对照梅毒蛋白 (Syphilis-his) 结合到镍离子柱,再与 p239 反应。咪唑洗脱产物经 SDS-PAGE 后分别与 HEV 单克隆抗体 16D7 及兔抗 his 多克隆抗体反应。结果显示 Gp78 与 Syphilis-his 在镍柱上的结合量基本相同, Gp78-his pull-down 组分中含有大量 p239, 而 Syphilis-his 中基本没有 p239 (图 1A), 表明 Gp78 可以不通过其他蛋白而直接与 p239 结合。

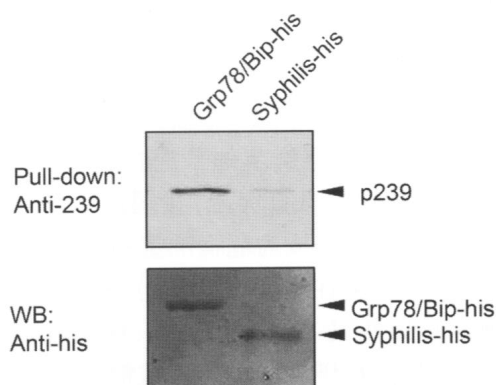


图 1A Pull-down 结果显示 Gp78 可以直接特异性结合 p239

Fig 1A. Pull-down assay results shows a direct interaction between p239 and Gp78

Gp78-his (Lane 1) or control protein syphilis-his (Lane 2) was first bound onto a Ni²⁺ column and then incubated with p239. Eluted p239 was examined by mAb 16D7. His-tagged Gp78 and syphilis bound on the column served controls for protein loading.

为验证上述结果,将原核表达的 Gp78 与 p239 共孵育,然后采用免疫共沉淀方法,将 HEV 单克隆抗体 16D7 及无关对照单克隆抗体先结合到

ProteinA/G 琼脂糖介质, 再与上述孵育产物结合并进行免疫印迹分析。结果显示 HEV 单克隆抗体 16D7 组能检测到 Gp78 而对照抗体组未能检测到 Gp78(图 1B), 进一步说明了 Gp78 与 p239 是直接相互作用。

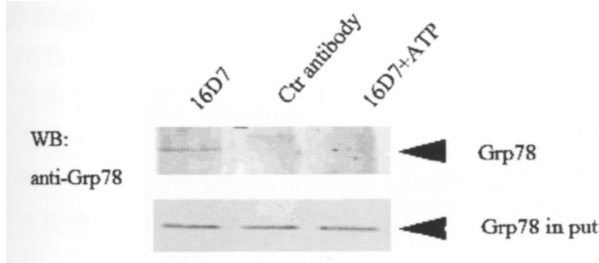


图 1B Gp78 与 p239 免疫共沉淀结果

Fig 1B. Results of the co-immunoprecipitation assay shows a direct interaction between p239 and Gp78

Recombinant Gp78 was incubated with p239 and immunoprecipitated with 16D7 (Lane 1), control antibody (Lane 2) or 16D7 washed with ATP (Lane 3). Reaction products were examined with anti-Gp78 antibody.

Gp78 本身具有 ATP 水解酶的活性^[15]。利用这一特性, 我们首先将 Gp78-his 结合到镍离子柱并与 p239 孵育, 然后分别用 PBS 及含 ATP 的 PBS 洗涤, 再用咪唑洗脱后进行免疫印迹实验。结果显示, Gp78-his 与镍离子柱结合量相同的条件下, 经 5 mmol ATP 洗涤的反应产物中 p239 含量明显减少(图 1C)。另外, 免疫共沉淀实验中, 采用 5 mmol ATP 洗涤后完全检测不到 Gp78(图 1B)。以上实验结果表明 ATP 可以部分解离 Gp78 与 p239 的结合。

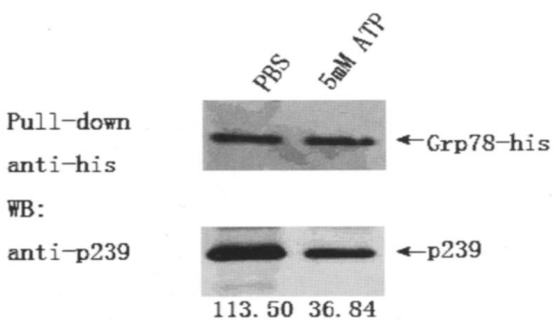


图 1C Pull-down 结果显示 5 mmol/L ATP 可以部分解离 p239/ Gp78 复合物

Fig 1C. The p239/ Gp78 complex can partially disassemble with 5 mmol/L ATP as measured by pull-down assay

The Gp78-his/p239 binding complex was washed with PBS (Lane 1) or 5 mmol/L ATP (Lane 2). Eluted p239 was examined by mAb 16D7. Bound Gp78-his was also examined as a control for protein loading. The numbers at the bottom represent the value of optical density of p239 bands adjusted by Gp78-his.

2. p239 通过构象型表位与 Gp78 相互作用 本

实验室前期研究表明 HEV ORF2 衣壳蛋白 597 ~ 602 氨基酸(aa) 位点为同源二聚体中 2 个单体的结合位点, 在病毒衣壳蛋白的组装过程中具有重要作用^[16]。我们将 p239 (368 ~ 606 氨基酸) C 端的 6 个氨基酸截除, 得到 p233 (368 ~ 600 氨基酸)。p233 和 p239 与线性单克隆抗体 16D7 的反应性一致(图 2A), 但 p233 因为无法形成正确构象而不能与 HEV 构象单克隆抗体反应(结果未附)。为了进一步阐明 p239 在与 Gp78 直接相互作用中的结合位点, 我们将 Gp78-his 固定于镍离子柱, 分别加入 p239、p233 孵育, 咪唑洗脱后免疫印记检测。结果显示, p233 几乎不与 Gp78 反应, 表明 p239 是通过构象型结构与 Gp78 直接相互作用(图 2A)。利用我们实验室已有的构象型单克隆抗体 8C11 孵育 p239, 再检测 p239 与 Gp78-his 的相互作用, 发现 8C11 能对这种相互作用产生阻断; 同时, 线性单克隆抗体 15B2 也

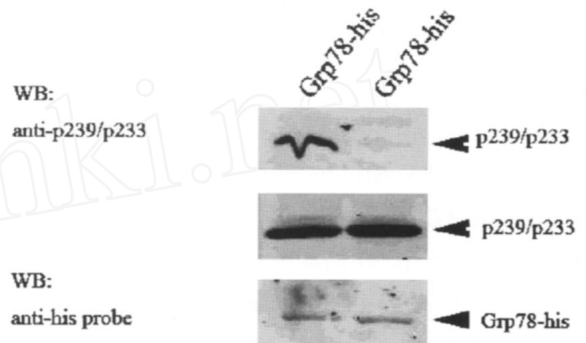


图 2A Pull-down 结果显示 p233 不能与 Gp78 结合

Fig 2A. Failure of p233 to bind with Gp78 as measured by pull-down assay

Eluted p239 (Lane 1) or p233 (Lane 2) was examined by mAb 16D7. Bound p239/p233 (middle panel) and Gp78-his (lower panel) were also examined as controls for protein loading.

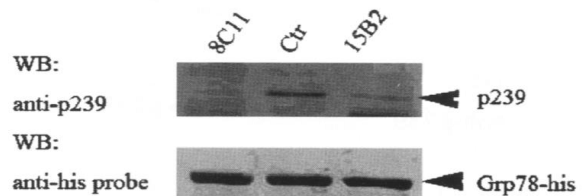


图 2B 构象单克隆抗体 8C11 阻断 p239 与 Gp78 直接结合

Fig 2B. Conformational mAb 8C11 blocks the interaction between p239 and Gp78 as measured by pull-down assay

p239 is shown pre-incubated with 8C11 (Lane 1), PBS (Lane 2) or linear mAb 15B2 (Lane 3) and then loaded onto a Gp78-his column. Elution products were analyzed by anti-p239 antibody. Bound Gp78-his was also examined by anti-his antibody as a control for protein loading.

能产生部分阻断,说明可能还有其他的线性位点参与两者的相互作用(图 2B)。以上结果表明,p239 在与 Gp78 的直接相互作用中主要是通过构象型结构来完成,该结构与 8C11 中和表位区域至少部分重叠。

3. p239 与 Gp78 在细胞膜上的共定位 有证据表明 Gp78 存在于细胞膜表面^[17],提示 Gp78 可

能在细胞膜上与 HEV 衣壳蛋白结合。我们将 p239 加入正常培养的 HepG2 细胞于 37 孵育 5 min,使得 p239 维持在细胞膜表面,固定后,分别用 16D7 单克隆抗体和商品化的兔抗 Gp78 多克隆抗体及相应荧光标记的二抗检测 p239 和 Gp78,然后进行激光共聚焦显微镜分析。结果表明,p239 和 Gp78 在 HepG2 细胞膜表面存在部分共定位(图 3)。

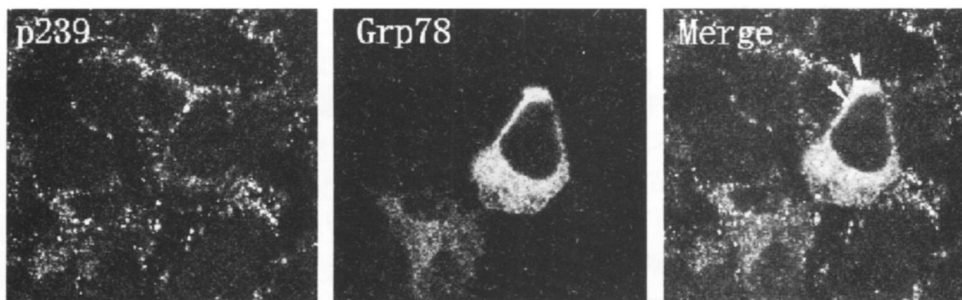


图 3 p239 与 Gp78 在细胞膜上的部分共定位

Fig 3. Confocal microscopy shows the partial co-localization of p239 and Gp78 on the HepG2 plasma membrane

4. Gp78 蛋白阻断 p239 吸附实验 前期研究表明 p239 可以吸附、进入 HepG2 细胞并有效阻断野生 HEV 对 HepG2 和原代培养肝细胞的感染,证实了 p239 含有和 HEV 相同的细胞结合位点^[12]。p239 和 Gp78 在 HepG2 细胞膜表面存在部分共定位提示 Gp78 可能介入 p239 的吸附、入胞过程。因此,我们用 Gp78 封闭 p239 表面的 Gp78 结合表位并观察对 p239 吸附细胞的影响。结果显示,Gp78 预孵育能够阻断约 50% 的 p239 对细胞的吸附(图 4),表明 p239 表面的 Gp78 结合区域确实参与了 p239 的入胞过程。

讨 论

近年来,随着各种病毒黏附因子及受体的发现,人们对病毒入胞过程的了解更加深入。这些细胞膜成分包括各种不同的蛋白质、脂、糖类(碳水化合物):如离子转运蛋白(ion transporters)、黏附因子(adhesion factors)、信号传导途径中的蛋白分子等^[18]。一种病毒往往有多种受体,即辅助受体,他们在病毒感染过程中共同或依次与病毒作用介导病毒内化。有报道指出,柯萨奇 A9 病毒(CAV-9)以整合素 $\alpha 3$ 及 Gp78 为共受体结合到宿主细胞表面,然后再利用与 Gp78 形成蛋白复合体的主要组织相容性复合物(MHC)完成病毒的内化^[19]。登革病毒也是利用肝细胞表面的 Gp78 为受体成功完成感染^[20]。

我们曾利用免疫共沉淀技术证明了 Gp78 与 p239 可以相互作用^[14],但免疫共沉淀在胞内形成的复合物有可能包含其他蛋白组分,即不能反应两者是否直接相互作用。为解决这一问题,在本研究中我们表达并纯化了 Gp78-his 融合蛋白,利用 pull-down 技术研究两者的关系,并且采用免疫共沉淀方法进行佐证,结果显示 Gp78 与 p239 可以直接结合,从而更进一步确证了两者的相互作用。此外,由于 Gp78 本身具有 ATP 水解酶活性,利用此特性,我们研究了 ATP 对 Gp78 与 p239 相互作用的影响,发现 ATP 可以部分解离两者的结合。至此,有理由认为 Gp78 与 p239 的结合是一种可逆的、生理性的结合。

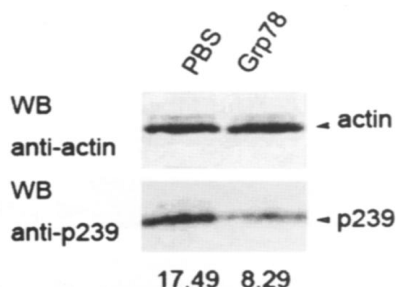


图 4 Gp78 预孵育可以部分阻断 p239 对肝细胞的吸附

Fig 4. Pre-incubation of Gp78 partially blocks the attachment of p239 on HepG2 cells

p239 was mixed with PBS (left) or Gp78 (right) and then incubated with HepG2. The amount of p239 on HepG2 cells was analyzed by Western blot. Actin expression was also examined as a control for protein loading. The numbers at the bottom represent the value of optical density of p239 bands adjusted by Actin.

本研究还发现, Gp78 可以与 p239 结合但不能与 p233 结合, 且 Gp78 与 p239 的结合可以被构象型单克隆抗体 8C11 完全阻断, 而线性单克隆抗体 15B2 却只能产生部分阻断, 表明两者的相互作用主要通过 p239 的构象型结构来完成, 此结构与 8C11 可能是部分或完全重叠的。至于 15B2 的部分阻断结果, 可能两者的结合同时有线性位点的参与, 或者是由于该抗体的空间位阻效应导致。这些假设还需要进一步研究加以确认。中和单克隆抗体 8C11 与野生 HEV 预先孵育后可以阻断 HEV 对恒河猴的攻击而使猴子免于感染和发病^[21], 但其机制尚不清楚。利用 HEV 可以低效感染体外培养的 HepG2 等肝细胞^[10]的特性, 我们在细胞水平上重复了 8C11 的保护实验, 发现 8C11 可以阻断病毒感染 HepG2, 说明 8C11 可以有效中和病毒对肝细胞的感染^[12]。本研究发现 p239 与 Gp78 的结合位点与 HEV 中和表位 8C11 拥有部分或完全的重叠。提示 Gp78 可能作为 HEV 的病毒受体而参与 HEV 的感染过程。

p239 可以较好地模拟 HEV 表面结构, 因此在没有建立起更好的 HEV 细胞感染模型时, 采用已经广泛深入研究的 p239 进行 HEV 感染机制的研究是有价值的。此外, Gp78 与 p239 在 HepG2 细胞膜表面存在部分共定位, 且纯化的 Gp78 蛋白可以部分阻断 p239 对 HepG2 细胞吸附。一方面再次证明了细胞表面 Gp78 介入了 p239 的入胞过程, 另一方面也提示 HEV 可能存在多个细胞膜的结合位点。所有上述证据都提示 Gp78 可能成为 HEV 在宿主细胞膜上的受体结合位点。为验证这一假设, 我们正在制备 Gp78 的单克隆、多克隆抗体, 希望可以利用抗体阻断病毒对宿主细胞的感染从而获得更直接的证据。

参 考 文 献

- Jaiswal SP, Jain AK, Naik G, et al. Viral hepatitis during pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*, 2001, 72:103 ~ 108
- Khuroo MS, Teli MR, Skidmore S, et al. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med*, 1981, 70:252 ~ 255
- 庄辉, 朱万孚, 李凡. 我国戊型肝炎研究进展. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19:448 ~ 450
- Tei S, Kitajima N, Takahashi K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 2003, 362:371 ~ 373
- 郑英杰, 张军, 夏宁邵. 戊型肝炎是否一种人畜共患病? *中国人兽共患病杂志*, 2003, 72:103 ~ 108
- Panda SK, Thakral D, Rehman S. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*, 2007, 17:151 ~ 180
- Krawczyk Z. Structure, expression regulation and function of endoplasmic reticulum proteins GRP78 and GRP95. *Postepy Biochem*, 1991, 37:70 ~ 75
- Cupitu AM, Petersson M, O'Donnell CL, et al. Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1998, 187:685 ~ 691
- Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis*, 2005, 192:930 ~ 933
- Emerson S U, Nguyen H, Torian U, et al. ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. *J Virol*, 2006, 80:10457 ~ 10464
- Zhang J, Gu Y, Ge S X, et al. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein. *Vaccine*, 2005, 23:2881 ~ 2892
- 苗季, 郑子峥, 何水珍, 等. 重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白 p239 特异性吸附、侵入 HepG2 细胞并阻断野病毒对肝细胞的感染. *病毒学报*, 2007, 23:325 ~ 328
- 何水珍, 郑子峥, 吴婷, 等. 戊型肝炎病毒细胞吸附模型的建立及病毒吸附区域初步研究. *病毒学报*, 2006, 22:426 ~ 430
- 吴小成, 何水珍, 郑子峥, 等. HepG2 细胞中与戊型肝炎病毒衣壳蛋白相互作用蛋白的初步研究. *病毒学报*, 2006, 22:329 ~ 333
- Kassenbrock CK, Kelly RB. Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides. *Embo J*, 1989, 8:1461 ~ 1467
- Li SW, Zhang J, He ZQ, et al. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid. *J Biol Chem*, 2005, 280:3400 ~ 3406
- Delpino A, Castelli M. The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BiP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep*, 2002, 22:407 ~ 420
- Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell*, 2006, 124:729 ~ 740
- Triantafyllou K, Fradelizi D, Wilson K, et al. GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class molecules which mediate virus internalization. *J Virol*, 2002, 76:633 ~ 643
- Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol*, 2004, 149:915 ~ 927
- 顾颖, 葛胜祥, 黄果勇, 等. 戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体的鉴定. *病毒学报*, 2003, 19:217 ~ 223

(收稿日期:2007-04-11)