

Az alternatív út diszreguláció hátterében álló patogenetikai tényezők vizsgálata trombotikus mikroangiopátiában

Doktori tézisek

dr. Trojnr Eszter

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Prof. Dr. Prohászka Zoltán

Hivatalos bírálók:

Dr. Ambrus Csaba Kálmán

Dr. Müller Judit

Komplex vizsga bizottság elnöke:

Prof. Dr. Benyó Zoltán

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Dr. Hegyesi Hargita

Dr. Sándor Noémi

Budapest

2019

Bevezetés

A komplementrendszer a veleszületett immunrendszer szerves része, hozzájárul a patogén kórokozók és immunkomplexek eliminálásához, biztosítja a redundáns sejtörmelék folyamatos eltakarítását és mindezekon keresztül meghatározó szerepet játszik az immunválasz szabályozásában. A komplementrendszer a klasszikus, a lektin és az alternatív utakon keresztül aktiválható, melyek jól definált szerepet töltenek be a kaszkád működésében és aktiválásukhoz specifikus trigger molekulák jelenléte szükséges. Eltérő szerepük ellenére azonban az egyes aktivációs utak a C3 molekula szintjén konvergálnak egymással, melynek hasítása a kaszkád közös, terminális útjának beindításához és ezen keresztül a célmolekula lítikus eliminálásához vezet.

Az alternatív út aktiválása a komplementrendszer működésében kettős szerepet játszik. Egyrészt rendelkezik egy alapszintű, folyamatos aktivitással, másrészt egy amplifikációs hurkon keresztül önmaga, illetve a klasszikus és a lektin utakon keresztül indított komplementaktiváció intenzitásának jelentős felerősítésére is képes. Tudniillik az egyes útvonalak kezdeti szakaszának aktivitásától függetlenül, a komplementaktiváció hatására keletkezett C3b zömét az alternatív utat erősítő hurok generálja. Mivel a C3b, mint a komplementrendszer fő opszoninja nemcsak az eliminálandó, hanem szervezetünk intakt sejtjeinek felszínéhez is kötődni képes, saját struktúráink védelme érdekében kiemelten fontos a komplementaktivitás megfelelő szabályozása.

A komplementrendszer féken tartása több mechanizmuson keresztül történhet. Fiziológiai körülmények között a komplementaktiváció megfelelő szabályozását a szérumban jelenlévő valamint membrán-kötött regulátor fehérjék biztosítják, melyek képesek a komplementrendszer hatékony gátlása mellett szervezetünk saját sejtjeinek idegen struktúráktól való megkülönböztetésére is. Komplementszabályozás történhet az aktivátor proteázok közvetlen gátlásán keresztül, az aktivitás szubsztrát-limitált restrikciónál, a kialakult C3-konvertázok lebontásának elősegítésével és a komplementaktivátor fehérjék kofaktor-mediálta hasításával. Ezen felül, a terminális út gátlása illetve a felszabadult anafilatoxinok inaktiválása is hozzájárul a komplementrendszer aktivitásának korlátozásához. A komplementregulátor molekulákon kívül, többek között a mintázatfelismerő molekulák családjába tartozó pentraxin-3 (PTX3) és C-reaktív protein (CRP) is részt vesznek a komplementaktivitás szabályozásában.

Az alternatív utat szabályozó mechanizmusok károsodása komplement diszregulációhoz és komplement-mediálta betegségek kialakulásához vezethet. A komplementrendszer

szabályozásának felborulását okozhatják a komplement szabályozó fehérjék diszfunkciója, illetve a komplementrendszer túlaktiválódása miatti másodlagos faktorkonzumpció is.

A trombotikus mikroangiopátiák (TMA) ritka, de életveszélyes betegségek. Az endotélkárosodás és az ennek következtében kialakuló mikrovaszkuláris trombózis a TMA patogenezisének kulcselemei, melyek a komplementrendszer túlaktivációjával és következményes komplementkonzumpcióval társulhatnak. A TMA-k klinikai diagnózisa mikroangiopátiás hemolitikus anémia és akut thrombocitopénia együttes fennállásakor kimondható, az egyes TMA formák etiológia szerinti elkülönítése azonban részletes laboratóriumi vizsgálatok függvénye.

Hagyományosan az atípusos hemolitikus urémiás szindróma (aHUS) volt az első TMA forma, melyben leírták a komplement diszreguláció patogenetikai szerepét. Atípusos HUS háttérében az alternatív út diszregulációja áll, mely patogén mutációk talaján vagy a komplementregulátor H faktor (HF) elleni autoantitestek jelenlétében alakul ki. Anti-HF antitestek jelenlétét aHUS-os betegek szérumában elsőként Dragon-Durey és munkatársai detektálták 2005-ben, majd ezt követően több független vizsgálat igazolta az autoantitestek funkcionális szerepét a betegség patomechanizmusában. HF-hez való kötődésüket követően az autoantitestek gátolják a komplementregulátor működését, mely a komplement alternatív út túlzott aktivitását és következményes komplement-mediálta szövetkárosodást von maga után. Míg az autoantitestek HF-kötésének funkcionális következményeit számos tanulmány vizsgálta, kevés ismerettel rendelkezünk az antitestek kötésében részt vevő epitópok helyzetéről a HF-on, melyek feltárása az autoantitestek működésének, és ezen keresztül a betegség patomechanizmusának megértéséhez lényeges adatokat szolgáltatna.

Atípusos HUS mellett az elmúlt évtizedek intenzív kutatási eredményei igazolták a komplementrendszer és a koagulációs kaszkád túlaktivációjának jelenlétét minden TMA formában. A koagulációs és komplement kaszkádok közös jellemzője, hogy aktiválódásukat lokális folyamatok, például szövetkárosodás, indukálják, melyek egy önmagát felerősíteni képes lánreakciót indukálnak. A két rendszer egyes elemei egymást kölcsönösen aktiválni képesek, ami magyarázza a patológiás trombózis és a komplementtúlaktiváció kialakulását TMA-ban. TMA akut szakaszában a komplement diszregulációt illetve túlaktiváció miatti konzumpciót egy jelentős gyulladáshoz vezető válasz kíséri, mely többek között gyulladáshoz vezető fehérjék, például CRP és PTX3 termelését indukálhatja. Irodalmi adatokból ismert, hogy a pentraxinok *in vitro* képesek mindhárom komplementút aktiválására és regulációjára is. Ezzel szemben az *in vivo* vizsgálatok ellentmondásosak a PTX3 szöveti sérülésre és regenerációra gyakorolt általános hatásait illetően, és ezidáig nem született tanulmány a pentraxinok szisztémás szintjének vizsgálatára komplementkonzumpcióval járó betegségekben.

Célkitűzések

1. A szisztémás pentraxin szintek és betegségaktivitás laboratóriumi jelei közötti összefüggés vizsgálata TMA-ban

A PTX3 és a CRP képesek a komplementrendszer szabályozására *in vitro*, ezidáig azonban nem született vizsgálat a szisztémás pentraxin szintek és azok változásainak meghatározására komplement-mediálta betegségekben, úgy mint TMA-k, *in vivo*. Mindezek tükrében célul tűztük ki egy eset-kontroll tanulmány elvégzését, melynek keretein belül meghatároztuk a szisztémás pentraxin szinteket TMA akut szakaszában valamint a betegség remissziójában. Vizsgáltuk az összefüggést a szisztémás pentraxin szintek, a betegség kimenetele és a betegségaktivitást jellemző klasszikus laboratóriumi paraméterek változása között.

2. A patológiás komplementaktiváció és a szisztémás pentraxin szintek közötti összefüggés vizsgálata különböző etiológiájú TMA formákban

TMA különböző etiológiájú formáiban úgy mint aHUS, típusos HUS (STEC-HUS), szekunder TMA és trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP), részletesen analizáltuk a szisztémás pentraxin szintek és a komplement túlaktiváció laboratóriumi jelei közötti összefüggést a betegség akut szakaszában. Meghatároztuk a betegek komplementfaktor szintjeit, klasszikus és alternatív út aktivitását valamint a komplementaktivációs termékek szisztémás szintjeit azzal a céllal, hogy feltárjuk a komplement túlaktiváció és a PTX3 illetve CRP szintek közötti lehetséges összefüggést TMA akut szakaszában. Ezen felül *in vitro* vizsgáltuk hozzáadott PTX3 hatását az alternatív út aktivitásra, hogy feltárjuk a PTX3 termelés TMA kialakulásában játszott patogenetikai szerepét.

3. Anti-H faktor antitestek epitópanalízise aHUS-ban

Az autoantitestek HF kötésének funkcionális következményeit széles körben vizsgálták, azonban kevés ismerettel rendelkezünk a HF blokádnak strukturális jellemzőiről valamint a HF rokon fehérjék (FHR-ek) aHUS patogenezisében betöltött szerepéről. A közelmúltban publikált megfigyelések alapján feltételeztük, hogy az autoantitest kötőhely a HF C-terminális szakaszán helyezkedik el. Munkánk során célul tűztük ki az autoantitestek HF kötésének strukturális jellemzését az antitestkötő epitópok azonosításán keresztül, a HF C-terminális doménjein. Az antitest kötésben részt vevő aminosavak azonosítása érdekében elvégeztük a regulátor epitóptérképezését aHUS-asszociált pontmutációkat hordozó HF domének és a HF 19-20-as short consensus repeat (SCR) doménjeit lefedő szintetikus peptidek segítségével. Ezen felül vizsgáltuk, hogy az aHUS-specifikus lineáris epitópok megtalálható-e az FHR1 HF-al homológ szakaszain, alapul véve az autoantitestek és az FHR1 között leírt keresztreakciót.

Módszerek

Vizsgált betegek és mintagyűjtés

Eset-kontroll vizsgálatunkba 171 TMA akut szakaszában szenvedő betegek válogattunk be a szisztémás pentraxin szintek és komplementkonzumpció jelenlétének meghatározása céljából. Beteganyagunkat olyan egyének képezték, akik vérmintáit differenciáldiagnosztikai céllal küldték laboratóriumunkba 2007 novembere és 2017 októbere között. A betegbeválogatás kritériuma volt a TMA diagnózisa mikroangiopátiás hemolitikus anémia és akut trombocitopénia (<150 G/L) valamint szervi károsodás laboratóriumi illetve klinikai jeleinek együttes fennállása alapján. A betegség akut szakaszában levett szérum illetve plazma mintákat a beválogatott betegektől a plazmakezelés megkezdése előtt gyűjtöttük, 16 betegünk azonban a mintavételt megelőzően friss fagyasztott plazma (FFP) infúzióban részesült. A betegek alcsoportok szerinti bontása céljából a következő etiológiai klasszifikációt alkalmaztuk: (1) STEC-HUS (N=34): akut gastroenteritis és akut veseelégtelenség tünetei igazolt Shiga-like toxint termelő *Escherichia coli* fertőzés mellett, (2) TTP (N=30): ADAMT13 deficiencia (10% alatti enzimaktivitás) ADAMTS13 inhibitorok igazolt jelenléte mellett, (3) aHUS (N=44): HUS anti-HF antitestek jelenléte mellett vagy HUS igazolt patogén illetve valószínűsíthetően patogén mutáció jelenléte mellett a komplementgénekből (*CFH*, *CFHR5*, *CFI*, *CD46*, *C3*, *CFB*), továbbá a *THBD* vagy *DGKE* génekből, illetve más okkal nem magyarázható HUS esetek igazolt, valószínűsíthetően patogén ritka variáció jelenléte nélkül, (4) szekunder TMA (N=63): TMA fennálló alapterbetegség talaján úgy mint malignus és autoimmun betegségek, szepszis, szervtranszplantáció, szívműtét és malignus hipertenzió. A kizárási kritériumok között szerepeltek a már zajló plazmaterápia illetve komplement-gátló kezelés a mintagyűjtéskor (a betegség akut szakaszában), illetve elérhető vérminta hiánya. A betegek klinikai kimenetelére vonatkozó adatok, valamint a vérképet és vérkémiát jellemző laboratóriumi paraméterek a betegdokumentációból kerültek kigyűjtésre. A betegség klinikai kimenetelét és a mortalitást regisztráltuk, illetve kórházi elbocsátást követően betegeinket utánkövettük és a remisszió időszakában vett vérmintákat is analizáltuk aHUS-ban (N=31) valamint TTP-ben (N=19). Eredményeink adekvát összehasonlításához korban és nemből illesztett egészséges kontroll személyek vérmintáit használtuk.

Az anti-HF antitestek epitóptérképezéséhez autoimmun HUS akut szakaszában szenvedő gyermekek szérummintáit alkalmaztuk, melyek a plazmakezelés megkezdése előtt kerültek levételre. Betegeink beválogatási kritériumai a következők voltak: HUS diagnózisa mikroangiopátiás hemolitikus anémia, akut trombocitopénia (<150G/L) és vesekárosodás együttes fennállásával, valamint 110 AU/mL feletti anti-HF szinttel. Betegeink kizárásra

kerültek, amennyiben a hozzánk érkezett vérminta első alkalommal aHUS remissziójában vagy a betegség aktív terápiája során került levételre úgy mint plazmaferezis, kortikoszteroid, ciklofoszfamid vagy rituximab terápia. Vizsgálatunkba összesen nyolc beteget vontunk be, közülük hét esetben állt rendelkezésünkre vérminta a betegség remissziójában is. A remisszió során vett minták 6-12 hónappal az aHUS specifikus kezelés befejezése után kerültek levételre. Kontrollként korban illesztett gyermekek szérummintáit alkalmaztuk, akik a Semmelweis Egyetem 1. Sz. Gyermekgyógyászati Klinikájára kerültek felvételre, azonban esetükben a részletes laboratóriumi vizsgálatok (gyulladásos paramétereket is beleértve) patológiás elváltozást nem mutattak. Minden kontroll gyermek anti-HF szintje a normál tartomány felső határa alatt maradt.

Mindkét fent említett humán vizsgálat a Helsinki Deklarációval összhangban lett kivitelezve, melyhez az illetékes Kutatásetikai Bizottság a vizsgálat megkezdése előtt hozzájárulását adta (8361- 1/2011-EKU).

Laboratóriumi paraméterek meghatározása TMA akut szakaszában

Vizsgálatunk során meghatároztuk a betegek komplementaktivitási paramétereinek, komplementfaktor és aktivációs termékeinek szintjét, valamint a szisztémás CRP and PTX3 szinteket TMA akut szakaszában. A betegek alternatív út aktivitását a kereskedelmi forgalomban kapható WIESLAB Alternatív út ELISA-val mértük (EuroDiagnostica, Malmö, Svédország), míg a teljes komplement klasszikus út aktivitást birkavörösvértest hemolitikus titrációs teszttel haátroztuk meg. A CRP, C3 and C4 szintek turbidimetria segítségével kerültek meghatározásra (Beckman Coulter, Brea, USA), míg a B faktor (BF) és I faktor (IF) szinteket radiális immundiffúzió segítségével kvantifikáltuk. A C1q és HF szinteket valamint az anti-HF antitest titeret házi beállítású ELISA segítségével mértük. Az ADAMTS13 aktivitás meghatározásához a FRETS-VWF73 fluorigén szubsztrátot alkalmaztuk. Kereskedelmi forgalomban kapható esszéket alkalmaztunk a szolubilis C5b-9 (sC5b-9), a C3a (C3a des-arg) szintek meghatározására (Quidel, San Diego, CA, USA) valamint a PTX3 szintek detektálására is (R&D systems Minneapolis, MN, USA).

PTX3 alternatív út aktivitásra kifejtett hatásának vizsgálata *in vitro*

Rekombináns humán PTX3 alternatív út aktivitásra kifejtett hatását két módszerrel vizsgáltuk. Az alternatív út hemolitikus aktivitását hozzáadott PTX3 jelenlétében vagy anélkül, egy módosított C3 nefritikus esszé segítségével határoztuk meg. A kísérlethez mosott birka vörösvértesteket és normál humán szérumot (NHS) alkalmaztunk, melynek lítikus aktivitását graduálisan csökkenő koncentrációban hozzáadott rekombináns humán PTX3 (R&D systems Minneapolis, MN, USA) jelenlétében illetve anélkül mértük. NHS és PTX3 20 perces

inkubációja után az oldatot mosott vörösvértestekhez adtuk, majd a C3 konvertáz felépülését követően a terminális komplement komplex (C5b-9) kialakulását, és a következményes vörösvértest lízist patkányszérum rendszerünkhöz adásával értük el. A hemolízis mértékét spektrofotométerrel határoztuk meg, az így kapott optikai denzitás értékekből az alternatív út lítikus aktivitását számítottuk. Annak érdekében, hogy a PTX3 alternatív út aktivitásra kifejtett hatásának mindkét irányú változását detektálni tudjuk, a kísérleti körülményeket úgy módosítottuk, hogy a puffer kontrollt tartalmazó NHS által okozott lízis mértéke a pozitív kontrollhoz (100%) képest 50% legyen. Az alternatív út aktivitást és a C5b-9 komplex kialakulását egy lipopoliszachariddal fedett műanyag felszínen a WIESLAB Alternatív út ELISA kit segítségével határoztuk meg, szintén NHS-t és csökkenő koncentrációban hozzáadott rekombináns humán PTX3-at alkalmazva. A két eltérő módszer segítségével nyert adathalmaz összehasonlíthatósága érdekében az alternatív út aktivitás mértékét a referenciaérték (puffer kontrollt tartalmazó NHS=100%) százalékos arányában fejeztük ki.

Szilárd fázisú peptid szintézis és lineráris epitópok meghatározása a H faktoron valamint FHR1-en

A HF 19-20-as SCR doménjeit valamint a regulátor 1177–1211-es aminosav pozíciója közötti szakasszal homológ FHR1 szakaszt lefedő peptideket Dr. Uray Katalin az Eötvös Loránd Tudományegyetemen szintetizálta Geysen metódusa alapján. A tizenöt aminosav hosszú, öt aminosavanként átfedő peptideink összesen 45 önálló aminosav szekvencia alapján készültek, peptidenként két párhuzamossal. A szilárd fázisú peptidszintézis a peptid C-terminálisól az N-terminális irányba történt egy funkcionális polietilén tű rendszeren, Fmoc/tBu védőcsoportok alkalmazásával (Mimotopes NCP gears Clayton, Australia).

A szintetizált peptidek antitest kötését egy módosított ELISA technika segítségével detektáltuk. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolása után a tüket a betegek szérumával inkubáltuk. Ezt követően a tüket jelölt anti-humán IgG-vel inkubáltuk (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), majd az antitest kötés mértékére a 3,3',5,5'-tetrametil benzidin (TMB) hozzáadásával indukált szubsztrátreakció színintenzitásából következtettünk. Negatív kontrollként a HSP60 hőszokkfehérje 480-489-es aminosavakig tartó szakasza szolgált. Az abszorbancia leolvasásával nyert adatokat a következő formula alapján normalizáltuk: OD_{minta}/OD_{min} , ahol OD_{minta} megegyezett a párhuzamosként szintetizált peptidek OD értékeinek átlagával, míg OD_{min} a HSP60 peptid párhuzamosok OD értéknek átlagával.

Rekombináns HF domének szintézise és antitest kötésének vizsgálata

Az aHUS-asszociált pontmutációkat (és következményes aminosavcseréket) hordozó, rekombináns HF domének antitest kötésének mértéke ELISA módszer segítségével került meghatározásra Dr. Józsi Mihály és kollégái segítségével az Eötvös Loránd Egyetemen működő partner laboratóriumunkban. A rekombináns fehérje domének klónozása, expressziója és tisztítása a QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA), a *Pichia*-expressziós rendszer majd végezetül heparin affinitáskromatográfia alkalmazásával történt (HiTrap Heparin, Amersham Bioscience, Egyesült Királyság). Az így nyert fehérjedomének antitest kötését ELISA rendszerben teszteltük. A lemezek protein fragmensekkel való fedését követően inkubáltuk azokat a betegek szérumával, ez utóbbiakat a detektált antitest titernek megfelelő hígításban alkalmazva (1:50–1:200). A fehérjék antitest kötését peroxidáz-konjugált anti-humán IgG és TMB szubsztrátreakció segítségével detektáltuk. Az egyes fragmensek antitest kötésének standardizált összehasonlítása érdekében a mutációt hordozó peptidek antitest kötését a vad típusú HF 19-20-as domének antitest kötésének százalékos arányában fejeztük ki.

Epitópok azonosítása a H faktor térszerkezeti modelljén

A H faktoron azonosított lineáris epitópok és az antitest kötést befolyásoló aminosavcserék elhelyezkedését a komplementfehérje 19-20-as SCR doménjeinek Protein Data Bank adatbázisból letöltött térszerkezeti modelljén, SWISS-PDB Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) segítségével analizáltuk.

Statisztika

Kísérleti eredményeink analíziséhez a GraphPad Prism 6.00 szoftvert alkalmaztuk (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com). Mivel a fentiekben részletezett kísérleti eredmények folytonos változói nem normál eloszlást mutattak, ezért az egyes csoportok összehasonlításakor non-paraméteres tesztek alkalmaztak, kétoldalas p-értékkel, 0.05-ös szignifikancia szintet meghatározva. Az egyes összehasonlításokhoz alkalmazott statisztikai metódust a megfelelő ábraalírás tartalmazza.

Eredmények

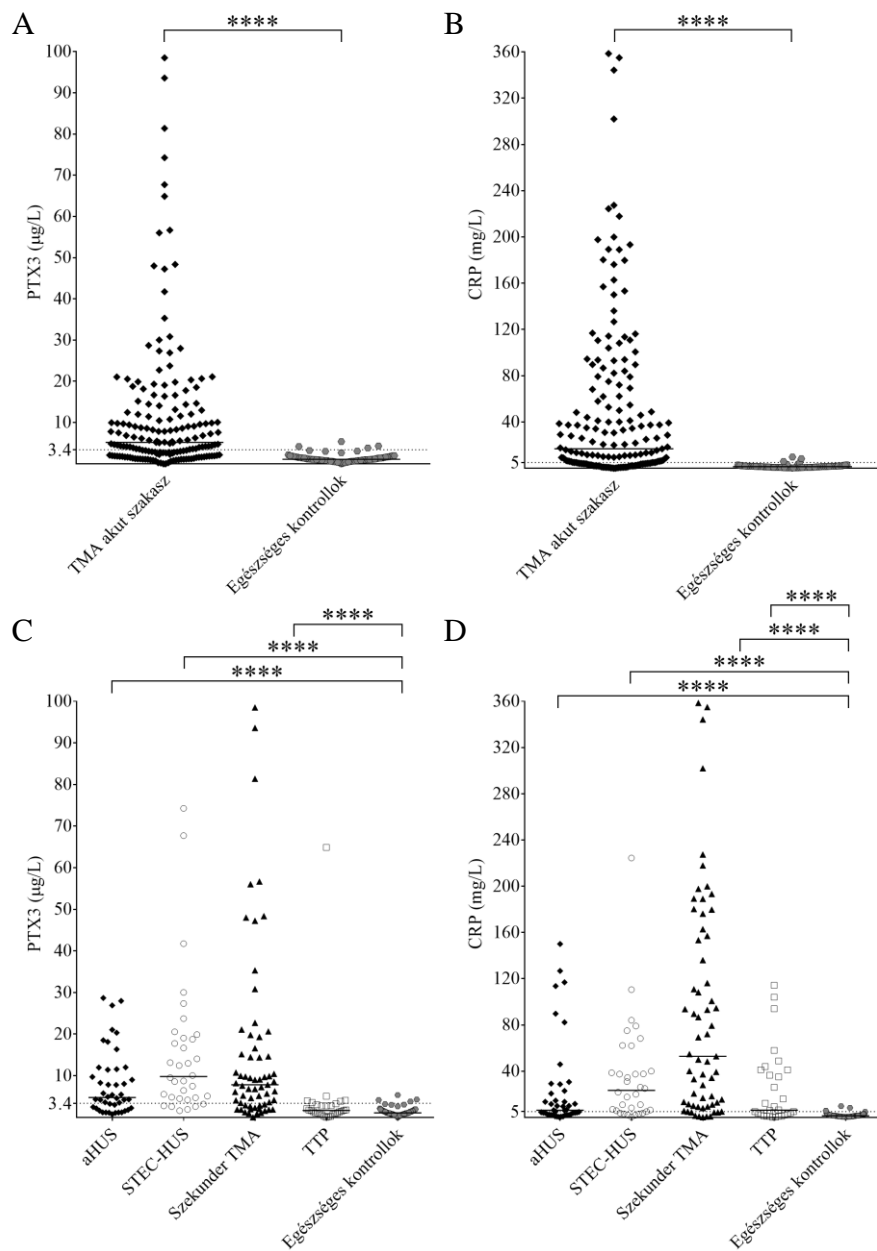
1. A szisztémás pentraxin szintek és betegségaktivitás laboratóriumi jelei közötti összefüggés vizsgálata TMA-ban

Pentraxin szintek TMA akut szakaszában és kapcsolatuk a betegségaktivitást jelző laboratóriumi paraméterekkel valamint a betegség klinikai kimenetelével

A keringésben lévő PTX3 és CRP szintek szignifikáns emelkedést mutattak TMA akut szakaszában egészséges kontrollokhoz képest. Emelkedett PTX3 és CRP szinteket detektáltunk minden etiológia szerinti TMA alcsoportban, bár a PTX3 emelkedés TTP-ben csak kivételes esetben fordult elő, dacára a TTP-s betegek 53%-ában kimutatható emelkedett CRP szinteknek (1. Ábra, A-D). Az egyes betegcsoportok további alcsoportokra bontásával megállapítottuk, hogy mindkét pentraxin szintjének emelkedése független volt az aHUS molekuláris hátterétől és a szekunder TMA-hoz vezető alapbetegségtől is. A normál tartomány egészséges kontrollokban detektált CRP szintekből számított felső határa (5.01 mg/L) megfelelt a laboratóriumunkban, diagnosztikus céllal alkalmazott 5mg/L-es határértéknek, míg a PTX3 szintek felső határát a kontroll csoportban mért értékek alapján 3.40 µg/L-ben állapítottuk meg.

A PTX3 szintek összefüggést mutattak a betegségaktivitást jelző és szervi károsodásra utaló laboratóriumi paraméterekkel. Szignifikáns pozitív korrelációt detektáltunk a laktát dehidrogenáz (LDH) és PTX3 szintek között, valamint gyenge pozitív korreláció mutatkozott a trombocitaszám illetve vesekárosodás laboratóriumi jelei és a PTX3 szintek között. Ezzel szemben a CRP nem mutatott összefüggést a betegség súlyosságára utaló laboratóriumi jelekkel, leszámítva a kreatinin értékekkel mutatott szignifikáns pozitív korrelációt. Mindemellett a szisztémás PTX3 és CRP szintek erős pozitív korrelációt mutattak egymással és a szisztémás gyulladásos válaszra utaló laboratóriumi paraméterekkel úgy mint fehérvérsejtszám és abszolút neutrofil szám. Mivel a betegek trombocitaszámának változása megbízhatóan jelzi a betegség aktivitásának változását, betegeinket a kórházi felvételkor detektált trombocitaszámuk alapján három alcsoportra bontottuk. A korrelációs analízis során detektált gyenge pozitív korreláció dacára az egyes alcsoportok PTX3 és CRP szintjei között nem mutatkozott statisztikailag szignifikáns különbség, továbbá minden alcsoport PTX3 és CRP értékei szignifikáns emelkedést mutattak az egészséges kontrollok pentraxin szintjeihez képest. Az elemzett változók egymástól való függésének detektálása céljából paramétereinket két többváltozós regressziós modell segítségével is elemeztük. Az LDH (standardizált regressziós koefficiens $\beta=0.299$) a PTX3 szintek szignifikáns prediktorának bizonyult a többváltozós modellben, míg a trombocitaszám és a kreatinin szintek nem mutattak ilyen

irányú összefüggést. CRP esetében szignifikáns prediktorok voltak a hemoglobin (beta=0.183), a trombocitaszám (beta= -0.179) és a kreatinin (beta=0.338) értékek.



1. Ábra Szisztémás PTX3 és CRP szintek TMA-ban és egészséges kontrollokban

PTX3 and CRP szintek TMA akut szakaszában (A-B), valamint pentraxin szintek az etiológia szerinti TMA formákban (C-D) összehasonlítva egészséges kontrollokkal. A szimbólumok az egyes minták kísérletenkénti párhuzamosaiból számított PTX3 és CRP szintek átlagértékeit mutatják, míg az alsóportonkénti vízszintes vonalak a csoport mediánt jelölik. Szaggatott vonal jelzi az egyes pentraxinok normáltartományának felső határát. **** $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis teszt és Dunn's post hoc teszt. (aHUS= atípusos hemolitikus urémiás szindróma, CRP= C-reaktív protein, PTX3= pentraxin-3, STEC-HUS= típusos HUS, TMA= trombotikus mikroangiopátia, TTP= trombotikus trombocitopéniás purpura)

Pentraxin szintek TMA remissziójában

A STEC-HUS és a szekunder TMA általában egy akut epizóddal jelentkező TMA formák, melyekre a kiváltó ok megszüntetését követően nem jellemző visszaesés. Ezzel szemben, aHUS és TTP relapszusokkal tarkított betegségek, melyeket a vesefunkció progresszív károsodása illetve fokozódó neurológiai deficit jellemez. Annak érdekében, hogy képet kapjunk a betegség remissziója során detektálható pentraxin szint változásokról, 31 aHUS-ban és 19 TTP-ben szenvedő beteg remisszióban levett vérmintájában is meghatároztuk a szisztémás pentraxin szinteket. Az aHUS-ban szenvedő betegek 80%-ában mind a PTX3 mind a CRP szintek csökkenést mutattak a betegség akut szakában detektált értékekhez képest, habár a csökkenés mértéke csak a patogén mutáció-asszociált és autoimmun aHUS betegcsoportokban mutatkozott statisztikailag szignifikánsnak. Míg az aHUS remissziójában detektálható PTX3 szintek szignifikánsan emelkedettek voltak az egészséges kontrollokban mérhető szintekhez viszonyítva, addig a remisszióban mért CRP szintek nem különböztek a kontroll csoportban detektálható értékektől. TTP esetében az akut szakaszban mért alacsony PTX3 szintek nem változtak jelentős mértékben, és a CRP szintek is normalizálódtak az esetek 85%-ában.

A szisztémás pentraxin szintek összefüggése a halálalozással TMA akut szakaszában

A továbbiakban vizsgáltuk a szisztémás pentraxin szintek összefüggését a kórházi halálalozással a szekunder TMA alcsoportban, ahol a mortalitás meghaladta a 30%-ot a TMA epizód első hónapjában. Ezzel szemben, mindössze egy beteg exitált a TTP csoportban és nem detektáltunk halálalozást az STEC-HUS és aHUS csoportokban. Szekunder TMA-ban a medián PTX3 szint emelkedése összefüggést mutatott az akut szakasz mortalitásával, míg a medián CRP szint nem különbözött szignifikánsan az epizódot túlélő illetve az azt túl nem élő betegek között. Az optimális vágópont az akut szakaszt túlélő és az elhunytak betegcsoportjának elkülönítésére 9 µg/mL-nek bizonyult (esélyhányados 3.08 (95% CI 1.02-9.33)). A betegségaktivitás fő indikátoraira való egyenkénti korrekció eredménye alapján a magas PTX3 szint a mortalitás hemoglobin és kreatinin szintektől független prediktorának bizonyult, nem volt független azonban a vérlemezke számtól és az LDH szinttől.

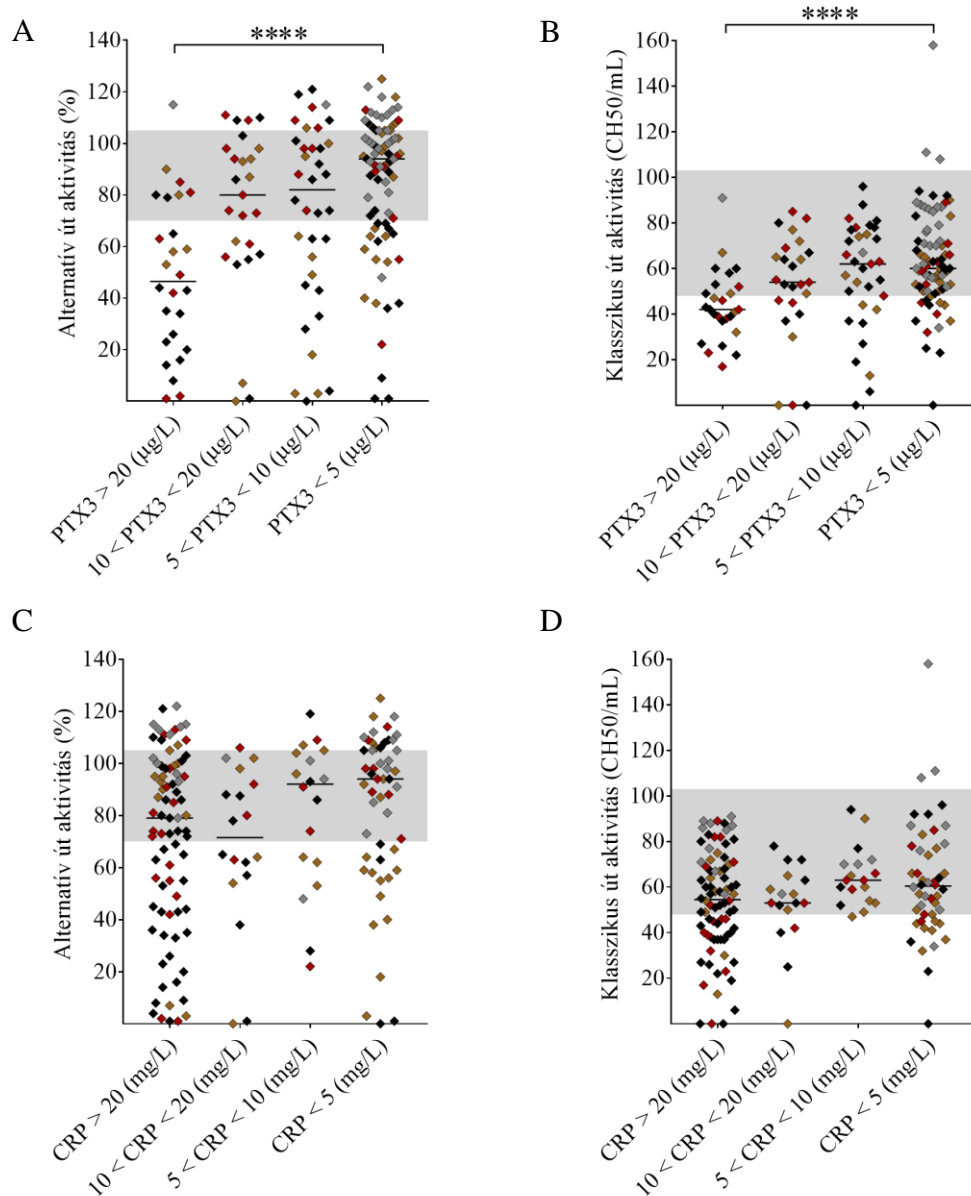
2. A patológiás komplementaktiváció és a szisztémás pentraxin szintek közötti összefüggés vizsgálata különböző etiológiájú TMA formákban

Komplementkonzumpció laboratóriumi jelei TMA akut szakaszában és ezek kapcsolata a szisztémás pentraxin szintekkel

Irodalmi adatok alapján komplementkonzumpció bármely TMA akut szakaszában kialakulhat. Ezzel összhangban, saját betegeink közel 50%-ában detektáltunk csökkent C3 szintet, mely utal a komplementrendszer túlaktivációjára, míg mindösszesen betegeink 8%-ánál (14/171) hiányoztak teljes mértékben a patológiás komplementaktivációra utaló laboratóriumi jelek (normál tartományon belüli C3, C4, HF, IF és BF szintek, valamint megtartott klasszikus út és alternatív út aktivitás a komplementaktivációs termékek szintjének emelkedése nélkül). Továbbá igen nagy számú, eltérő etiológiájú TMA formában szenvedő betegünkönél detektáltunk csökkent HF szintet, mely alátámasztja a komplementdiszreguláció jelenlétét minden általunk vizsgált TMA alcsoportban.

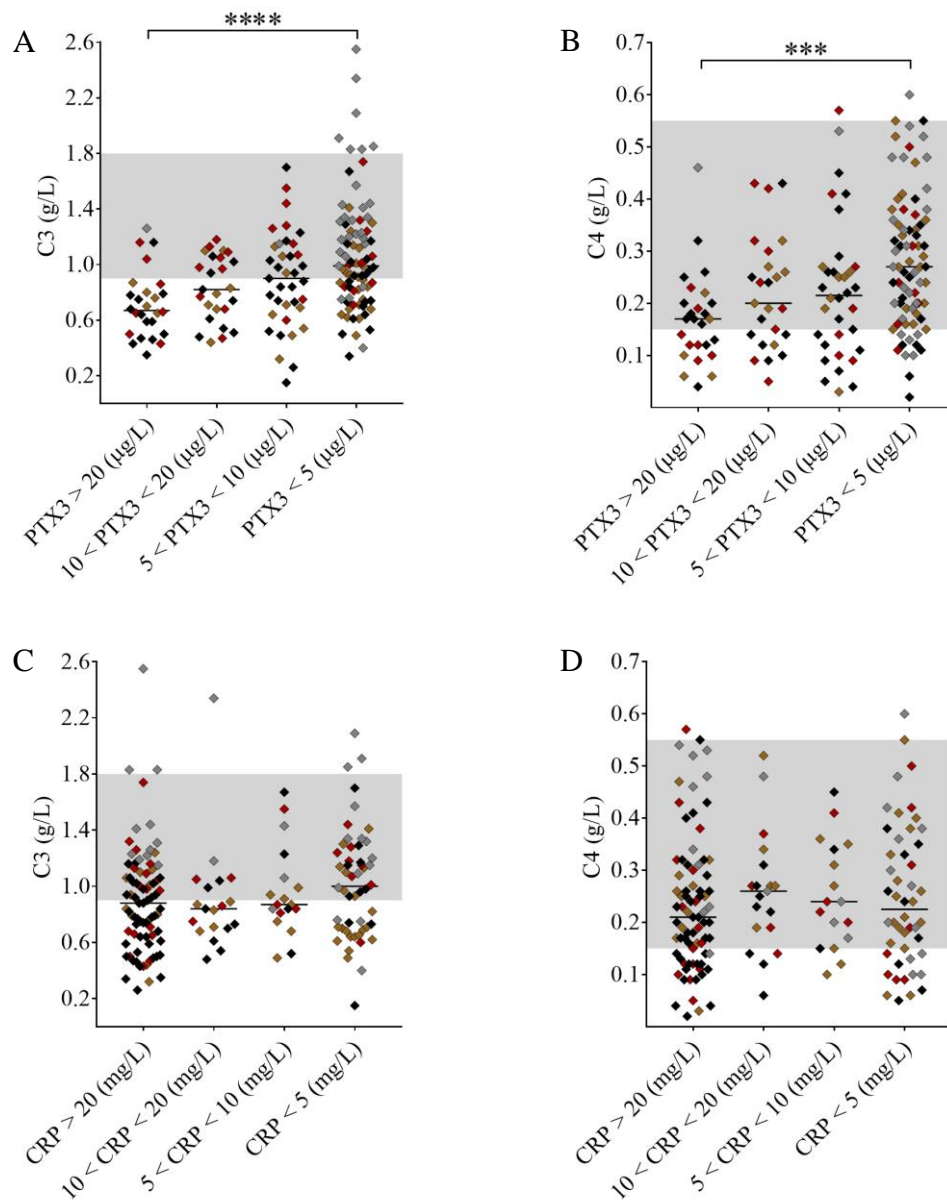
A szisztémás pentraxin szintek és a komplementkonzumpció közötti összefüggés vizsgálatára betegeinket a mért PTX3 és CRP szintek szerinti alcsoportokra bontottuk. Szoros összefüggést találtunk a PTX3 szint graduális emelkedése és a komplement alternatív illetve klasszikus út aktivitás csökkenése között (2. Ábra A, B). A klasszikus és alternatív út aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt a 20 µg/L-nél magasabb PTX3 szinttel rendelkező betegekben mint azokban, akiknél 5 µg/L-nél alacsonyabb PTX3 szintet detektáltunk. Ráadásul azokban a betegcsoportokban, melyek tagjaiban 20 µg/L feletti PTX3 szintet detektáltunk, az alternatív és klasszikus út aktivitás medián értéke is a normál tartomány alsó határa alá esett, mely a kifejezett komplementkonzumpció jele. A komplementrendszer túlaktivációja és a következményes faktorkonzumpció eredményeként mind a C3 mind a C4 szintek szignifikánsan csökkent értéket mutattak a 20 µg/L feletti PTX3 szinttel rendelkezők csoportjában, összehasonlítva az 5 µg/L-nél alacsonyabb PTX3-el rendelkezőkkel (3. Ábra A, B). Mindazonáltal, a graduális PTX3 szint emelkedést nem kísérte a HF és BF szint jelentős csökkenése, míg a komplementaktivációs termékek szintje a szisztémás PTX3 szinttől függetlenül minden betegcsoportban emelkedett maradt.

Ezzel szemben a szisztémás CRP szintek és a komplementaktiváció laboratóriumi jelei között nem találtunk összefüggést (2. Ábra C, D; 3. Ábra C, D). Mivel betegeink számottevő hányada TMA akut szakaszában 20 mg/L feletti CRP szintet mutatott, analízisünket a betegek további alcsoportokra bontásával finomítottuk (20 mg/L < CRP < 40 mg/L; 40 mg/L < CRP < 60 mg/L; 60 mg/L < CRP < 80 mg/L; 80 mg/L < CRP), azonban ezt követően sem találtunk összefüggést a CRP szint emelkedés és a patológiás komplementaktiváció laboratóriumi jelei között.



2. Ábra A szisztémás PTX3 és CRP szintek összefüggése az alternatív út és klasszikus út aktivitásával

Az x tengely a TMA akut szakaszában szenvedő betegeket mutatja a mért PTX3 (A, B) és CRP (C, D) szintek szerinti bontásban, míg a mért alternatív (A,C) és klasszikus (B, D) út aktivitás az y tengelyen ábrázolódik. Az egyes rombuszok a mintánkénti párhuzamosok átlagértékeit mutatják, színjelölésük megfelel az etiológia szerinti TMA besorolásnak (barna= aHUS, piros= STEC-HUS, fekete= szekunder TMA, szürke= TTP). A vízszintes vonalak az egyes csoportok medián értékeit mutatják, míg az egyes paraméterek normáltartományait szürke sávval jeleztük. **** $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis teszt és Dunn's post hoc teszt. (aHUS= atípusos hemolitikus urémiás szindróma, CRP= C-reaktív protein, PTX3= pentraxin-3, STEC-HUS= típusos HUS, TMA= trombotikus mikroangiopátia, TTP= trombotikus trombocitopéniás purpura)

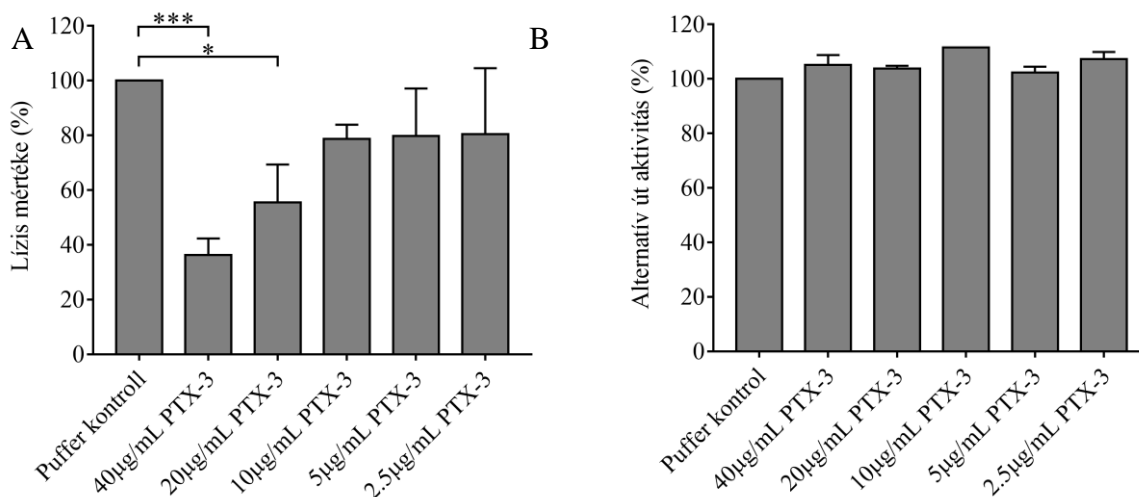


3. Ábra A szisztémás PTX3 és CRP szintek összefüggése a C3 és C4 szintekkel

A *x tengely* a TMA akut szakaszában szenvedő betegeket mutatja a mért PTX3 (A, B) és CRP (C, D) szintek szerinti bontásban, míg a mért C3 (A,C) és C4 (B, D) szintek az *y tengelyen* ábrázolódnak. Az egyes rombuszok a kísérletenként párhuzamosok átlagértékeit mutatják, szín jelölésük megfelel az etiológia szerinti TMA besorolásnak (barna= aHUS, piros= STEC-HUS, fekete= szekunder TMA, szürke= TTP). A vízszintes vonalak az egyes csoportok medián értékeit mutatják, míg az egyes paraméterek normáltartományait szürke sávval jeleztük. **** $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis teszt és Dunn's post hoc teszt. (aHUS= atípusos hemolitikus urémiás szindróma, CRP= C-reaktív protein, PTX3= pentraxin-3, STEC-HUS= típusos HUS, TMA= trombotikus mikroangiopátia, TTP= trombotikus trombocitopéniás purpura)

PTX3 hatásának vizsgálata az alternatív út aktivitásra in vitro

Mivel TMA akut szakaszában *in vivo* a komplementaktiváció fokozódását a szisztémás PTX3 szint graduális emelkedése kísérte, a jelenség funkcionális jelentőségének meghatározása céljából megvizsgáltuk PTX3 alternatív út aktivitásra kifejtett hatását *in vitro* körülmények között is. Egy módosított hemolitikus esszé segítségével meghatároztuk az alternatív út aktivitás okozta hemolízis mértékét hozzáadott rekombináns humán PTX3 jelenlétében és anélkül (4. Ábra, A panel). Kísérleti modellünkben PTX3 NHS-hez adása dózis-függően gátolta a vörösvértestek hemolízisét, azaz a sejtfelszínen létrejövő alternatív út aktivitást. Ezzel szemben PTX3 NHS-hez adása nem változtatta érdemben az ELISA lemez felszínén zajló alternatív út aktivitást és a következményes C5b-9 lerakódást (4. Ábra, B panel).



4. Ábra PTX3 hatása az alternatív út aktivitásra in vitro

Rekombináns humán PTX3 hatása az alternatív út hemolitikus aktivitására (A) valamint a lipopoliszacharid indukálta alternatív út aktiváción keresztüli C5b-9 depozícióra (B). A detektált alternatív út aktivitást a puffer kontrollt tartalmazó normál humán szérum aktivitásának arányában, százalékban fejeztük ki. Az oszlopok három egymástól független kísérlet átlagértékeit mutatják az átlag standard hibájával együtt. *p<0.05; ***p<0.001, Kruskal-Wallis teszt és Dunn's post hoc teszt.(PTX3=pentraxin-3)

3. Anti-H faktor antitestek epitópanalízise atípusos hemolitikus urémiás szindrómában

Az autoimmun aHUS-ban szenvedő betegek klinikai és laboratóriumi jellemzői

A HF elleni autoantitestek epitóptérképezéséhez autoimmun aHUS-ban szenvedő gyermekek szérumát használtuk, melyek a plazmaferezis illetve az immunszuppresszív kezelés megkezdése előtt kerültek legyűjtésre. Nyolc betegről nyertünk szérum mintát a betegség első

shubjának akut szakaszában, melyek közül hat nem részesült plazmaterápiában a vérvételt megelőzően, míg kettő FFP infúziót kapott a vérvétel előtt. Az autoimmun aHUS-ban szenvedő gyermekek medián életkora 9 év volt a diagnózis felállításakor, ennek tükrében a lineáris epitóptérképezéshez korban illesztett egészséges gyermekek (N=10) szérummintáit használtuk kontrollként. Hét gyermek esetében lehetőségünk volt a remisszió időszakában, az aHUS specifikus terápia (plazmaferézis, FFP, immunszuppresszió kortikoszteroidokkal, ciklofoszfamiddal, rituximabbal illetve ezek kombinációjával) befejezését követően is mintát venni. A klinikai remisszió időszakában vett vérmintákat leghamarabb hat hónappal a terápia befejezését követően nyertük. Ugyan betegeink akut szakaszban mért anti-HF szintje minden esetben meghaladta a normáltartomány felső határát, jelentős egyéni különbségeket regisztráltunk az egyes betegek akut szakaszban detektált antitest titerét illetően, mely 209 és 10067 AU/mL között mozgott. Továbbá, ugyan az utánkövetés időszaka minden betegünkben relapszus mentesen zajlott, az anti-HF titer hétből három esetben pozitív maradt.

A lineáris autoantitest kötő epitópok helyzete a H faktoron aHUS akut szakaszában és a betegség remissziójában

A szintetikus peptidek autoantitest kötését ELISA módszer segítségével mértük. Három, a kontrollokhoz képest fokozott autoantitest kötést mutató epitópot azonosítottunk a HF-on, a következő lokációkban: az 1157-1171-es aminosav közötti szakasz a HF 19-es doménjén valamint az 1177-1191 és az 1207-1226-os aminosavak közti szakaszok a regulátor 20-as doménjén (5. Ábra). Ezek az epitópok az anti-HF antitest titerben detektált egyéni különbségek ellenére minden betegünkben fokozott antitest kötést mutattak a betegség akut szakaszában. Atípusos HUS remissziójában az autoantitestek által felismert epitópok helyzete nem változott az akut szakaszhoz képest, azonban az antitest kötés mértéke csökkent. Ugyan az antitest kötés csak a peptidek egyikénél (1177-1191 peptid) csökkent szignifikáns mértékben, midegyik azonosított epitóp esetében az átlagos jelintenzitás legalább 25% -os csökkenése volt detektálható.

A H faktor és FHR1 autoantitestkötő lineáris epitópjainak összehasonlítása

A HF és FHR1 C-terminális doménjei 99%-ban homológok, egymástól mindössze két aminosavban különböznek. Mivel hét betegünk az FHR1-et kódoló gén (*CFHR1*) homozigóta, egy pedig annak heterozigóta delécióját hordozta, lineáris epitóptérképezésünk részeként a FH-ban és az FHR1-ben eltérő két aminosavat tartalmazó régió átfedő peptidjeit is megszintetizáltuk. Atípusos HUS akut szakaszában az FHR1 276-290-es peptidjéhez a kontrollokhoz képest szignifikánsan emelkedett autoantitest kötését detektáltuk, mely szakasz megfelelt a HF-on korábban azonosított autoantitest kötő epitópnak (1177-1191-es peptid).

Ugyan aHUS remissziójában mind a HF mind a vele homológ FHR1 epitópok autoantitest kötése csökkent, ennek mértéke csak a HF-en azonosított epitóp (1177-1191) esetében volt szignifikáns. Az autoantitest kötés csökkenésének mértéke azonban hasonlóan mutatkozott a homológ peptidek között, mely arra utal, hogy az érintett szakaszok közötti két aminosav különbség az autoantitestek kötődését nem befolyásolta.

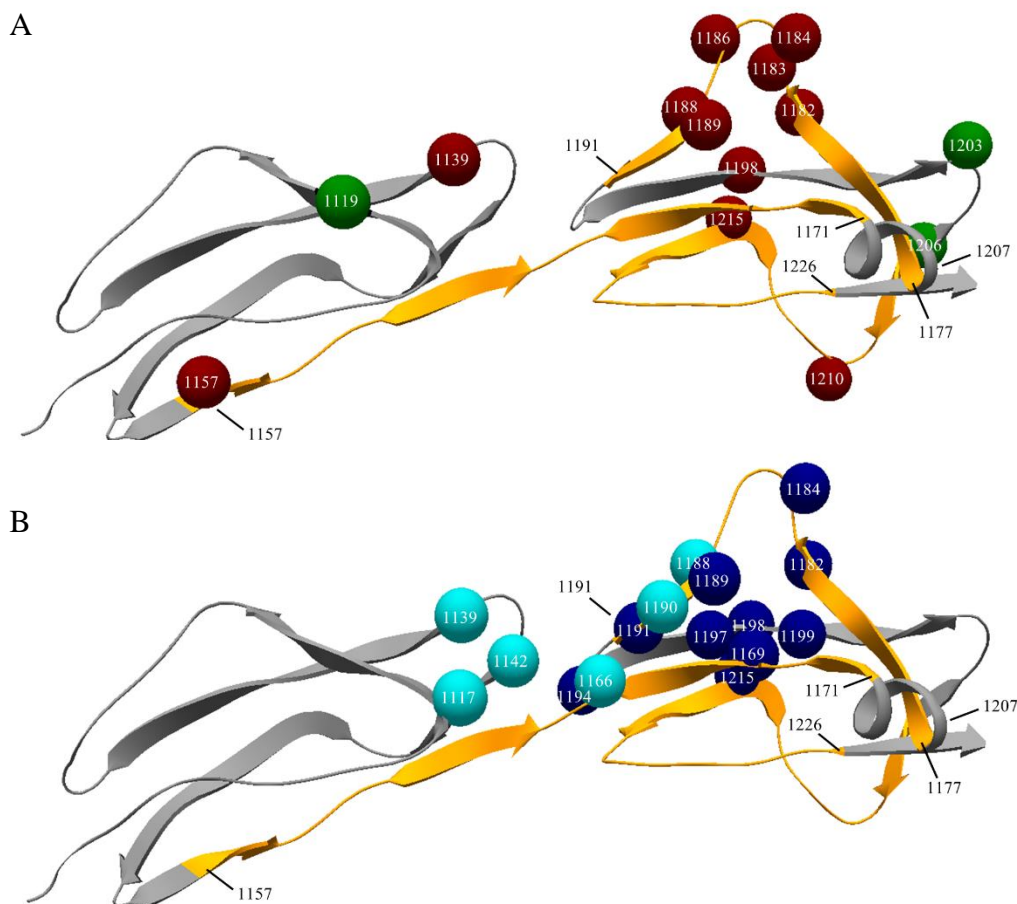
Rekombináns H faktor fragmensek epitóptérképezése

Az aHUS asszociált patogén HF mutációk az esetek többségében a regulátor C-terminális SCR doménjein helyezkednek el, a C3b kötés és a sejtfelszíni proteinek felismerésének gátlását okozva. Mivel az autoantitestek HF kötése a fentiekhez hasonló funkcionális következményekkel jár, aHUS-asszociált pontmutációkat hordozó rekombináns HF fragmenseket alkalmaztunk az autoantitest kötésben rész vevő aminosavak detektálására, valamint lineáris epitóptérképezésünk eredményeinek validálására a HF doméneken. Kísérleteink során 14 eltérő aminosav-szubsztitúciót hordozó protein antitest kötését teszteltük egy ELISA rendszerben, három autoimmun HUS-ban szenvedő beteg szérumának felhasználásával. Az adatok egyesítését követően egy jól elhatárolható epitóp rajzolódott ki a HF 1183-as és 1198-as aminosav pozíciója között, szimmetrikusan csökkenő antitest kötést mutatva az 1188-as pozícióban elhelyezkedő aminosav irányába, ahol az aminosav-szubsztitúciót eredményező pontmutáció jelenléte esetén a legalacsonyabb autoantitest kötést detektáltuk. Ezen felül további aminosav-szubsztitúciók is az autoantitest kötés jelentős csökkenését eredményezték, mind a 19-es (1139-es és 1157-es pozícióban elhelyezkedő aminosavak), mind a HF 20-as doménjén (1210-es és 1215-ös pozícióban elhelyezkedő aminosavak) a lineáris epitópok elhelyezkedésével összhangban (5. Ábra, A panel).

A lineáris autoantitest kötő epitópok és az aHUS-asszociált pontmutációk elhelyezkedése a H faktor térszerkezeti doménjén

Két eltérő módszerrel végzett epitóptérképezésünk eredményeinek összevetése céljából elhelyeztük az általunk azonosított lineáris epitópokat és a rekombináns HF domének pontmutációi okozta aminosav szubsztitúciókat a HF harmadlagos szerkezetének Protein Data Bankból letöltött térszerkezeti modelljén (ID: pdb2g7i) (5. Ábra, A panel). Továbbá, ábrázoltuk a lineáris epitópokat a C3b és szialinsav kötésben részt vevő aminosavak pozíciójának tükrében (5. Ábra, B panel), hogy feltárjuk az antitestek HF kötésének funkcionális következményeit az azonosított epitópok és a regulátor szabályozó funkciójának betöltése szempontjából kulcsfontosságú aminosavak egymáshoz viszonyított helyzete alapján. Az azonosított lineáris epitópok térbeli szerkezetének rekonstrukciója szerint az aHUS akut stádiumában detektált 1157-1171-es epitóp egyenes szakaszként jelenik meg a H

faktor 19-es és 20-as SCR doménjeit összekötő régióban, míg az 1177-1191-es és 1207-1226-os epitópok U alakot felvéve a lineáris peptid C-terminális végéhez térnek vissza, mintegy közös konformációs epitópot alkotva.



5. Ábra A lineáris epitópok, aHUS-asszociált pontmutációk és ligandkötő helyek elhelyezkedése a H faktoron

A HF 19-20-as doménje harmadlagos szerkezetének modellje (Protein Data Bank (ID: pdb2g7i)). Az autoantitesteket kötő lineáris epitópok helyzetét narancssárga szín, míg az epitópokat határoló aminosavakat fekete számok jelzik (1157-1171-es, 1177-1191-es, 1207-1221-es aminosavak által határolt peptidszakaszok), a nyílhegyek a protein C-terminális irányába mutatnak. (A) Az általtunk tesztelt aminosav szubsztitúciókat az autoantitest kötésre való hatásuknak megfelelő színes gömbökkel szemléltettük, míg a gömbökben elhelyezkedő fehér számok mutatják azok pozícióját a proteinen (piros: az aminosav szubsztitúció szignifikánsan csökkent antitest kötés eredményezett, zöld: nem volt jelentős hatással az antitestek HF kötésére). (B) A HF ligandkötőhelyeinek lineáris epitópokhoz viszonyított helyzetét színes gömbökkel tüntettük fel (C3b kötőhelyek világoskék, sziálsav kötőhelyek sötétkék színnel jelezve), míg a gömbökben elhelyezkedő fehér számok mutatják azok pozícióját a proteinen. (aHUS= atípusos hemolitikus urémiás szindróma; HF = H faktor)

Következtetések

Munkánk során célul tűztük ki a szisztémás CRP és PTX3 szint emelkedés szerepének vizsgálatát különböző etiológiájú TMA formákban, továbbá vizsgáltuk a komplement diszreguláció hátterében álló molekuláris tényezőket autoimmun aHUS-ban. Első vizsgálatunk részeként tanulmányoztuk a szisztémás pentraxin szintek változásának összefüggését a betegségaktivitással és a komplementrendszer túlműködésének laboratóriumi jeleivel TMA akut szakaszában és remissziójában. Kísérleti eredményeink alapján a következőket állapíthatjuk meg. Az etiológiai háttértől függetlenül emelkedett CRP szint jelen lehet minden TMA formában, PTX3 szint emelkedés azonban csak aHUS-ban, STEC-HUS-ban valamint szekunder TMA-ban volt kimutatható, TTP-ben hiányzott. Mindkét pentraxin összefüggést mutatott a betegség súlyosságának laboratóriumi jeleivel. A legmagasabb mortalitást a betegség akut szakaszában a szekunder TMA csoportban detektáltuk, mely összefüggést mutatott a PTX3 szint emelkedéssel, de független volt a szisztémás CRP szintektől. Betegünk többségében patológiás komplementaktiváció és következményes konzumpció laboratóriumi jeleit észleltük függetlenül a TMA etiológiai hátterétől. Továbbá igazoltuk, hogy a PTX3 szint emelkedése összefüggést mutat a komplementkonzupció mértékével *in vivo*, míg *in vitro* hozzáadott PTX3 jelenléte csökkenti a vörösvértestek felszínén kialakuló alternatív út hemolitikus aktivitását, viszont nem befolyásolja azt az ELISA lemezek felszínén. Mindezen kísérleti eredmények a lokálisan emelkedett PTX3 szint endoteliális károsodással szembeni védő szerepére utalnak TMA akut szakaszában, mely védő hatás feltehetőleg közvetett módon, például komplementregulátor molekulák sejt felszínhez kötésén keresztül megy végbe.

Következő vizsgálatunk során a HF ellen termelt autoantitestek epitóptérképezését végeztük, azzal a céllal, hogy feltérképezzük a HF gátlás molekuláris mehanizmusát aHUS-ban. Azonosítottunk három lineáris antitest kötő epitópot a regulátor C-terminális szakaszán és egyet a HF-el homológ FHR1 fehérjén. Az epitópok egymáshoz közeli térbeli elhelyezkedése arra utal, hogy a lineáris struktúrák együttesen alkotják az antitest kötőhelyet a fehérje harmadlagos szerkezetén, és ezek átfedése az aHUS-asszociált pontmutációk helyzetével valamint a HF egyéb ligandjainak kötőhelyeivel alátámasztja az autoantitestek által okozott funkciókiesést, mely végső soron az alternatív út diszregulációjához vezet.

Kísérletes munkánk során a komplement diszreguláció egyes elemeinek molekuláris vizsgálatát végeztük különböző etiológiájú TMA formák akut szakaszában. Reményeink szerint eredményeink hozzájárulnak a TMA-k patogenezisének megértéséhez és a jövőben további molekuláris vizsgálatok alapjául szolgálhatnak.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk

- I. **Trojnár E**, Józsi M, Szabó Zs, Réti M, Farkas P, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Garam N, Mikes B, Sinkovits G, Mező B, Csuka D, Prohászka Z. Elevated systemic pentraxin-3 is associated with complement consumption in the acute phase of thrombotic microangiopathies. *Front Immunol.* 2019 Feb 25;10:240.
- II. **Trojnár E**, Szilágyi Á, Mikes B, Csuka D, Sinkovits Gy, Prohászka Z. Role of complement in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Magazine of European Medical Oncology* 2018 September, 11;3:227–234.
- III. **Trojnár E**, Józsi M, Uray K, Csuka D, Szilágyi Á, Milosevic D, Stojanović VD, Spasojević B, Rusai K, Müller T, Arbeiter K, Kelen K, Szabó AJ, Reusz GS, Hyvärinen S, Jokiranta TS, Prohászka Z. Analysis of Linear Antibody Epitopes on Factor H and CFHR1 Using Sera of Patients with Autoimmune Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Front Immunol.* 2017 Mar 30;8:302.

A disszertáció témájához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk

- IV. Petro CD, **Trojnár E**, Sinclair J, Liu ZM, Smith M, O'Brien AD, Melton-Celsa A. Shiga toxin (Stx) type 1a reduces the toxicity of the more potent Stx2a *in vivo* and *in vitro*. *Infect Immun.* 2019 Mar 25;87(4). pii: e00787-18.
- V. Bhattacharjee A, Reuter S, **Trojnár E**, Kolodziejczyk R, Seeberger H, Hyvärinen S, Uzonyi B, Szilágyi Á, Prohászka Z, Goldman A, Józsi M, Jokiranta TS. The major autoantibody epitope on Factor H in atypical Hemolytic Uremic Syndrome is structurally different from its homologous site in Factor H related protein 1 supporting a novel model for induction of autoimmunity in this disease. *J Biol Chem.* 2015 Apr 10;290(15):9500-10.