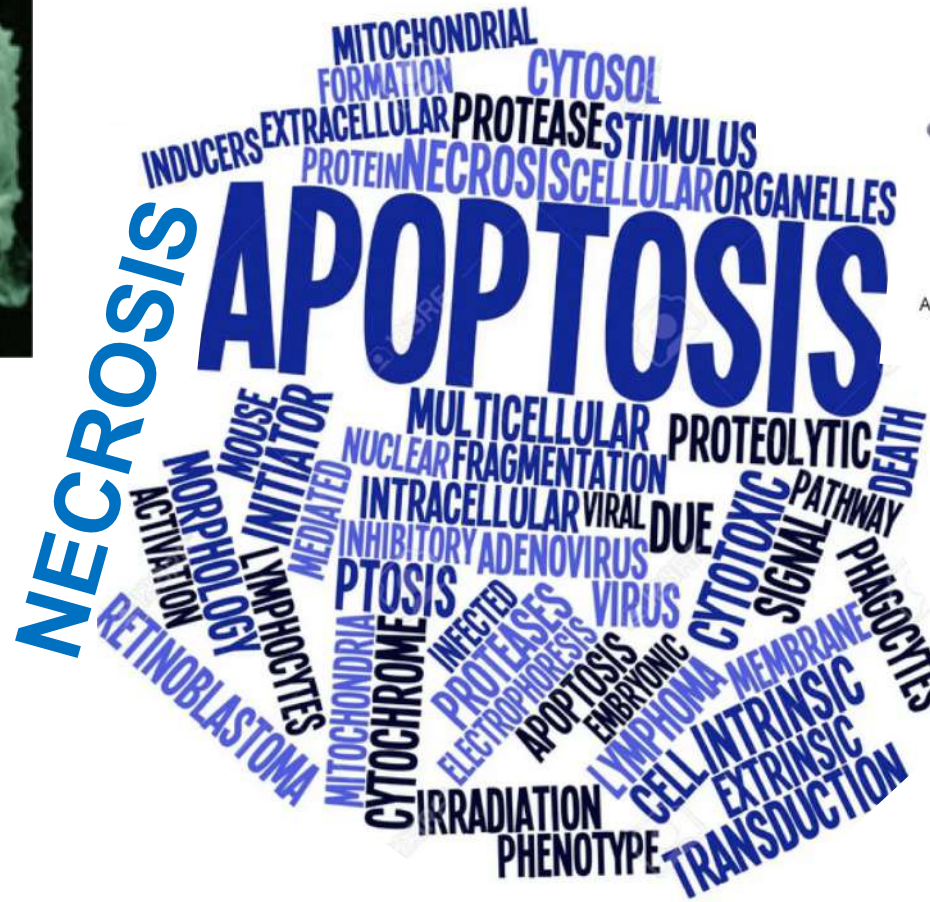
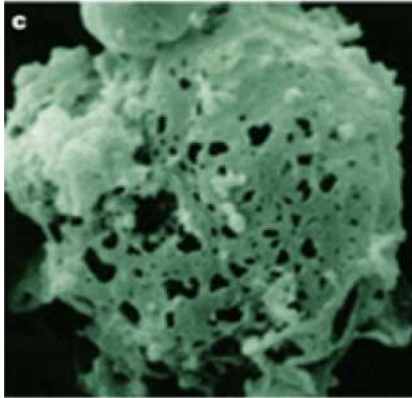
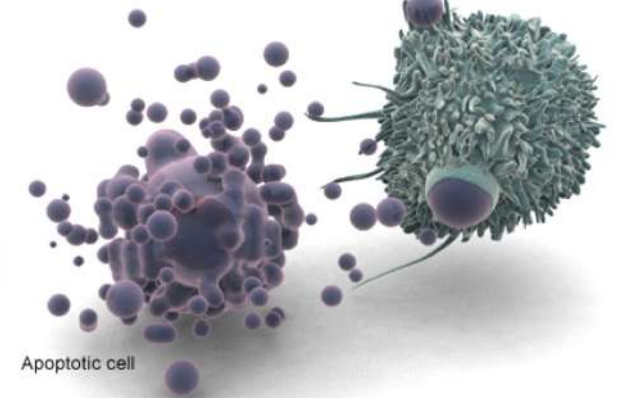


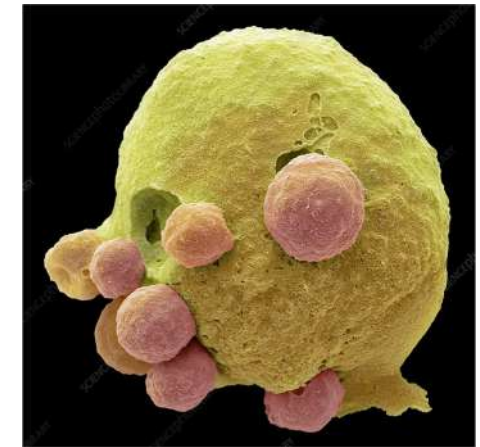


Final stage of apoptosis

White blood cell



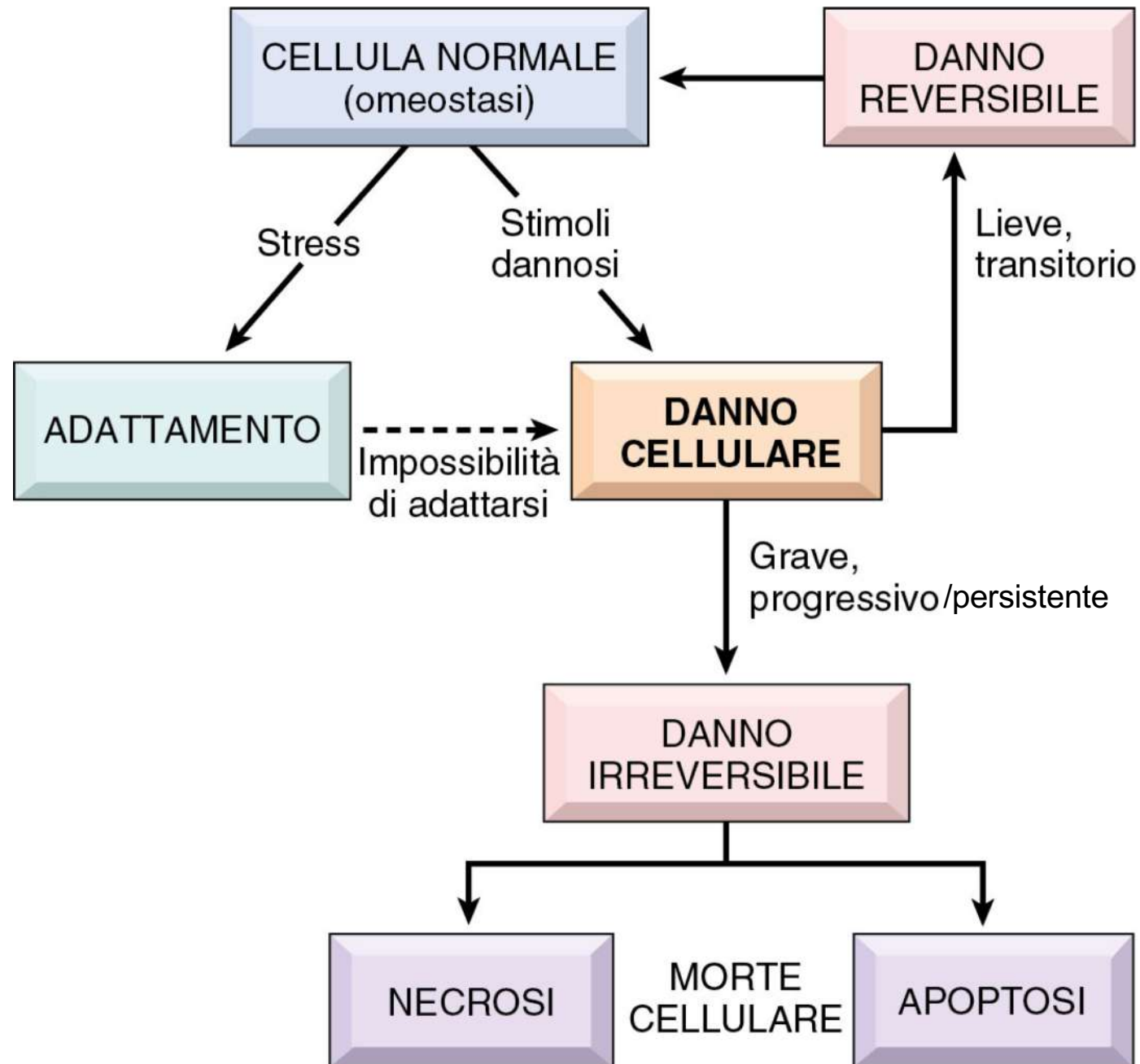
Apoptotic cell



Danno e morte cellulare

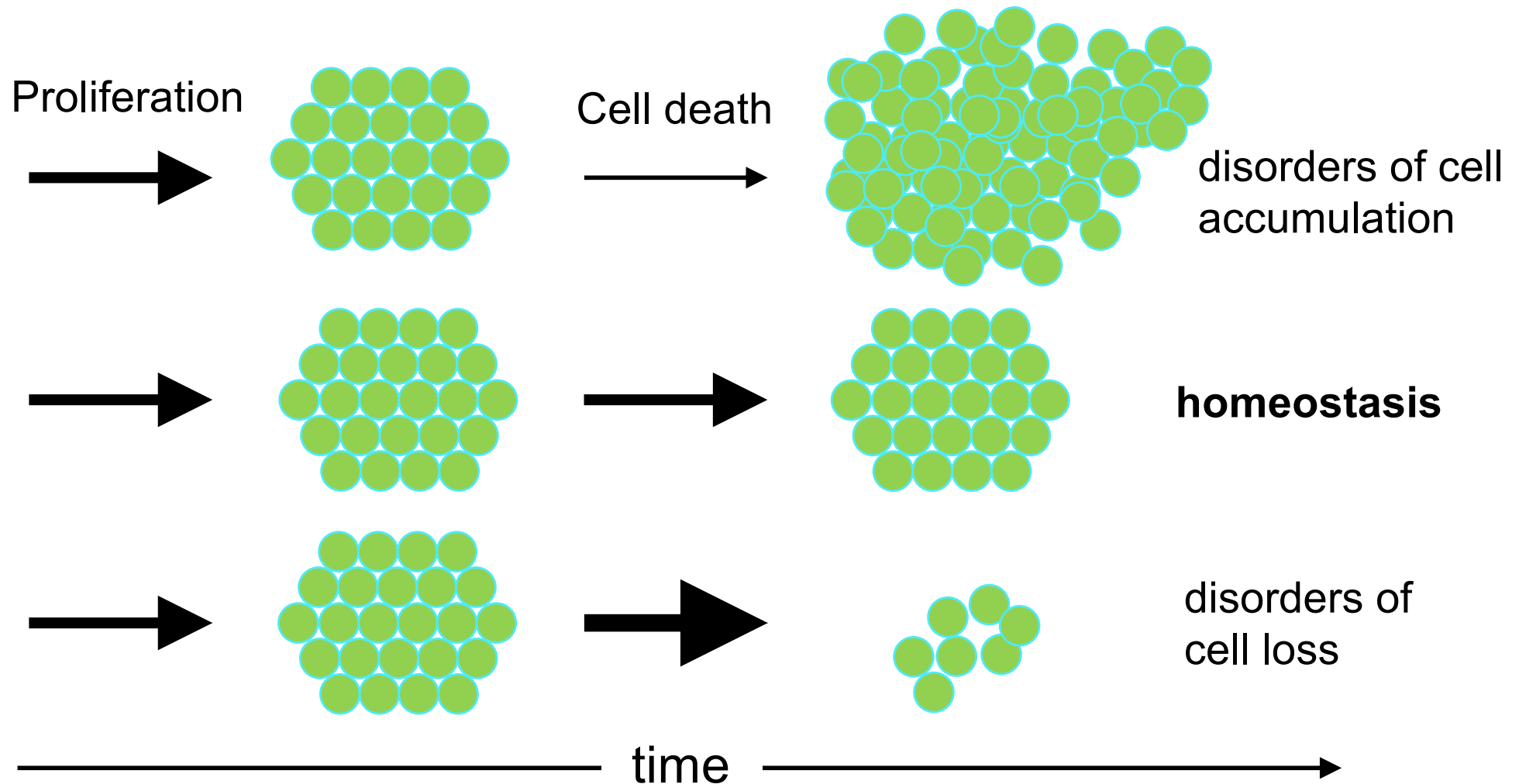
Necrosi e Apoptosi

Fasi delle risposte cellulari allo stress e agli stimoli patogeni

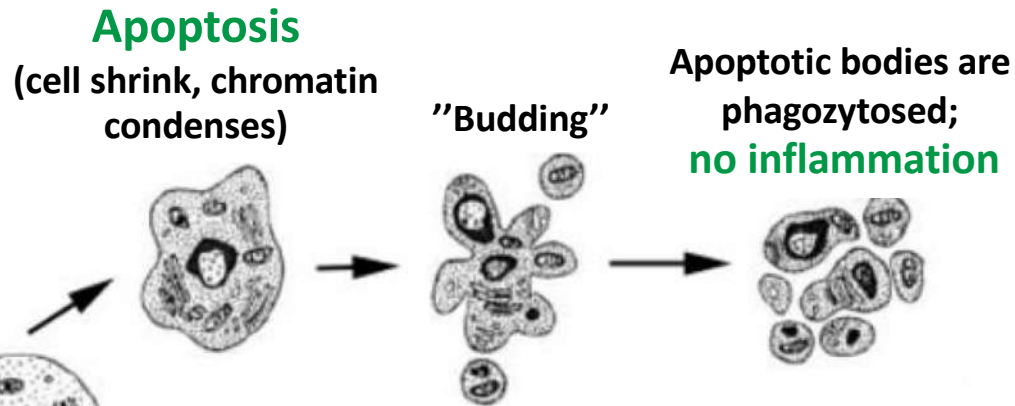
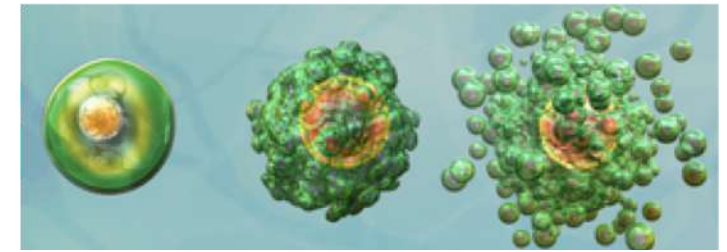


Proliferazione cellulare = morte cellulare → omeostasi

Ogni giorno il nostro organismo produce e distrugge 60 miliardi di cellule. La possibilità di controllare in entrata ed in uscita il numero di cellule fornisce flessibilità al sistema in risposta allo stress, alle ferite e a cambiamenti fisiologici ma può avere effetti patologici importanti.



La morte cellulare



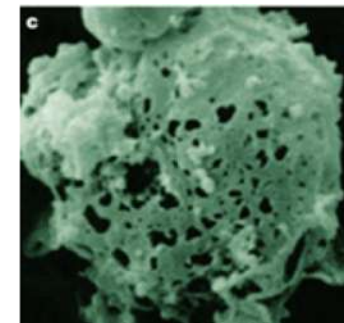
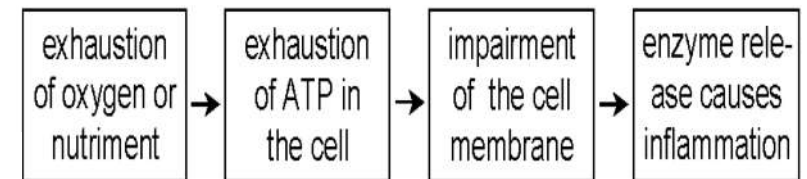
Viable Cell

Necrosis
(cell swells)

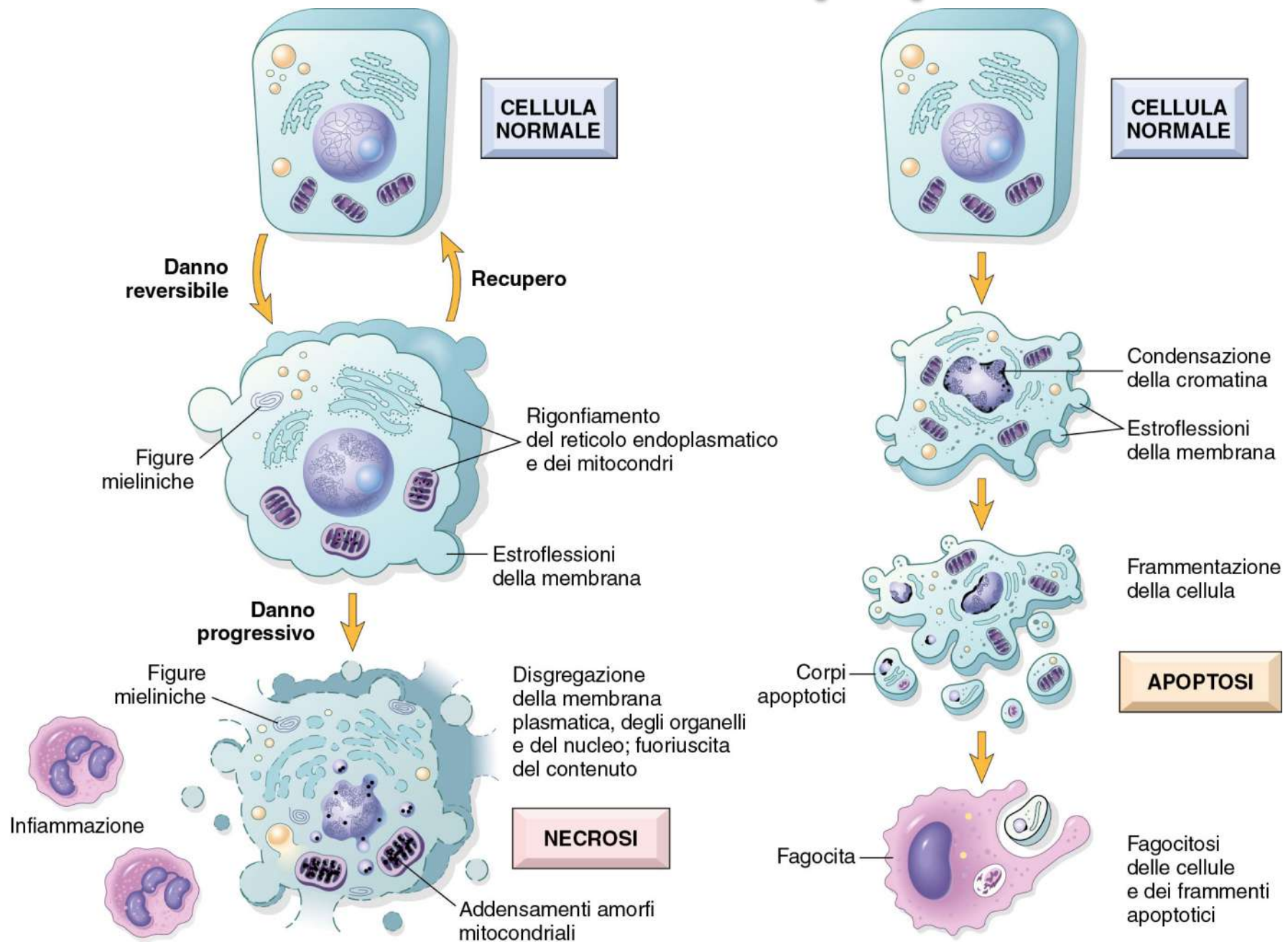
Cell becomes leaky, blebbing

Cellular and nuclear lysis causes
inflammation

Necrosis: "accidental" cell death affects a group of cells



Necrosi vs Apoptosi



NECROSI ← MORTE → APOPTOSI

Processo accidentale indotto da lesioni, sempre **patologico** e caratterizzato da:

- aumento del volume cellulare
- rottura delle membrane degli organelli e membrana plasmatica
- rilascio del contenuto cellulare nello spazio esterno e dei DAMP
(profili molecolari associati al danno cellulare quali ATP, acido urico, HMGB1)
- **induzione di infiammazione**

Processo **attivo** e altamente controllato, sia fisiologico che patologico caratterizzato da collasso delle strutture cellulari per digestione proteolitica selettiva con:

- aumento della densità cellulare
- disintegrazione del citoscheletro
- frammentazione del genoma
- formazione di corpi apoptotici
- **assenza di infiammazione**
che riduce il danno tissutale

Apoptosi

- Aggregazione della cromatina in masse compatte a ridosso della membrana nucleare
- Membrana nucleare convoluta
- La cellula diminuisce di volume, perde le strutture specializzate (es. microvilli, giunzioni cellula-cellula della membrana cellulare)
- Formazione di protuberanze della membrana: aspetto a pop-corn
- Condensazione del citoplasma
- Il nucleo si frammenta in corpi nucleari contenenti membrana nucleare integra e cromatina compatta
- Corpi apoptotici di forma sferica ed ovoidale costituiti da membrana intatta, alcuni organelli, citoplasma e frammenti nucleari
- Frammentazione del DNA
- Fagocitosi

**INTEGRITA' DELLE MEMBRANE E DEGLI ORGANELLI CITOPLASMATICI,
ASSENZA DI PROCESSI INFIAMMATORI**

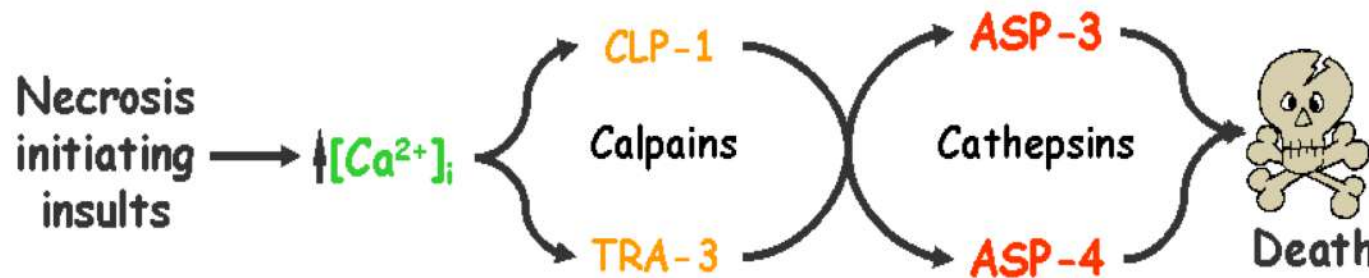
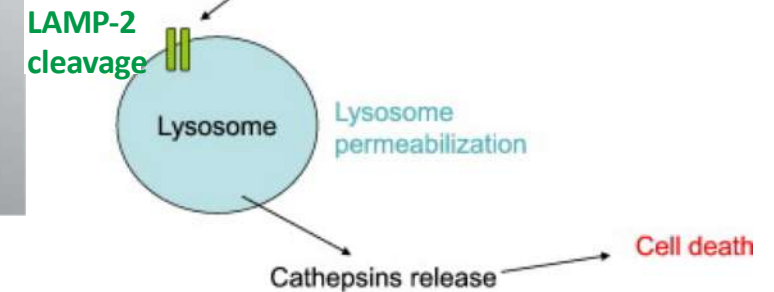
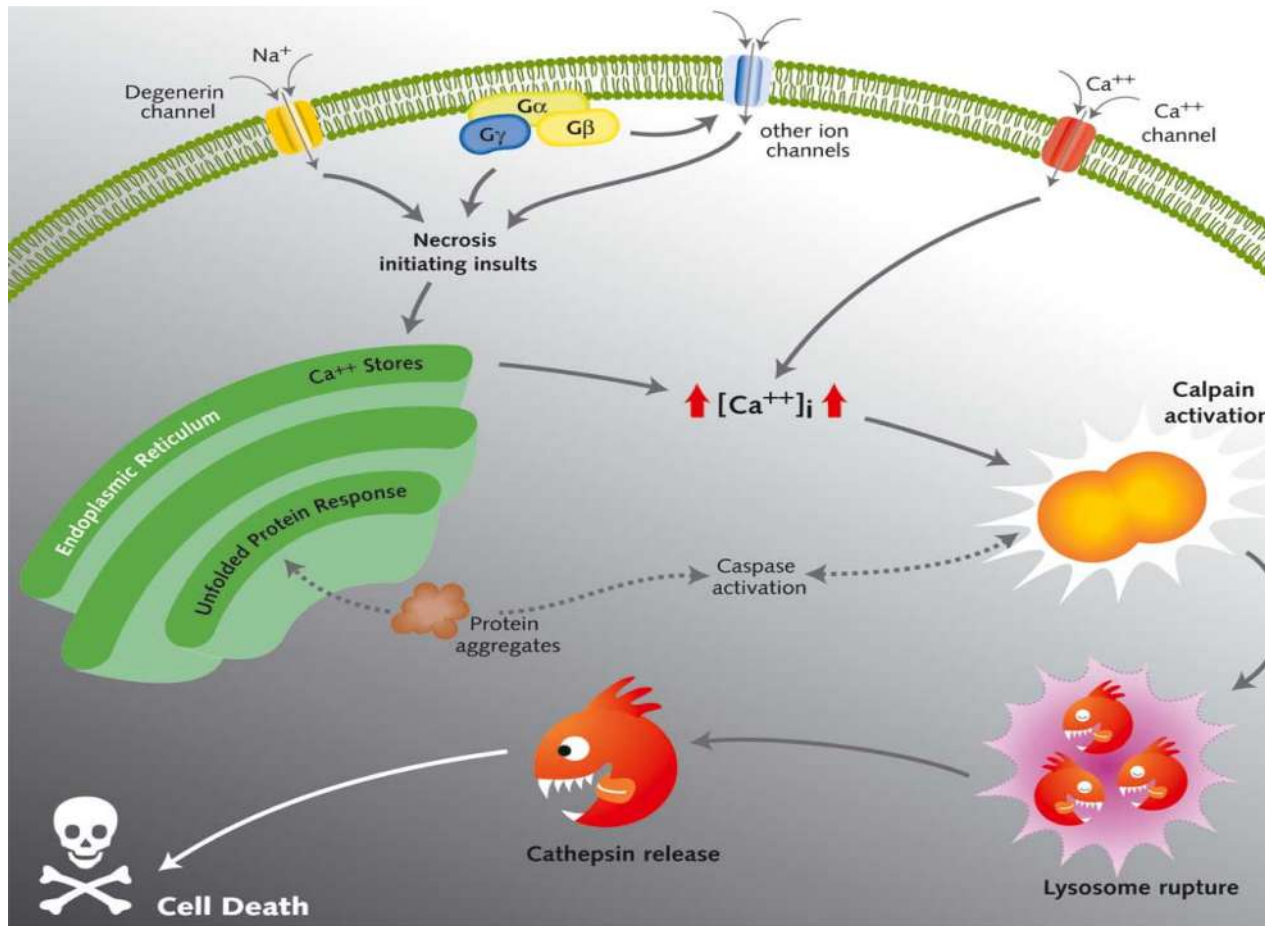
Necrosi

- Dilatazione del RE, dispersione dei ribosomi, corpi granulari nei mitocondri
- Ingrandimento della matrice mitocondriale
- Dissoluzione dei ribosomi e dei lisosomi
- Rottura delle membrane degli organelli e della membrana plasmatica
- Il citoplasma acquista eosinofilia (perdita di RNA citoplasmatico)
- Infiammazione per liberazione degli enzimi lisosomiali

ROTTURA DELLE MEMBRANE E INFIAMMAZIONE

Necrosi

Calpaine: attiva a pH neutro e attivata dal calcio

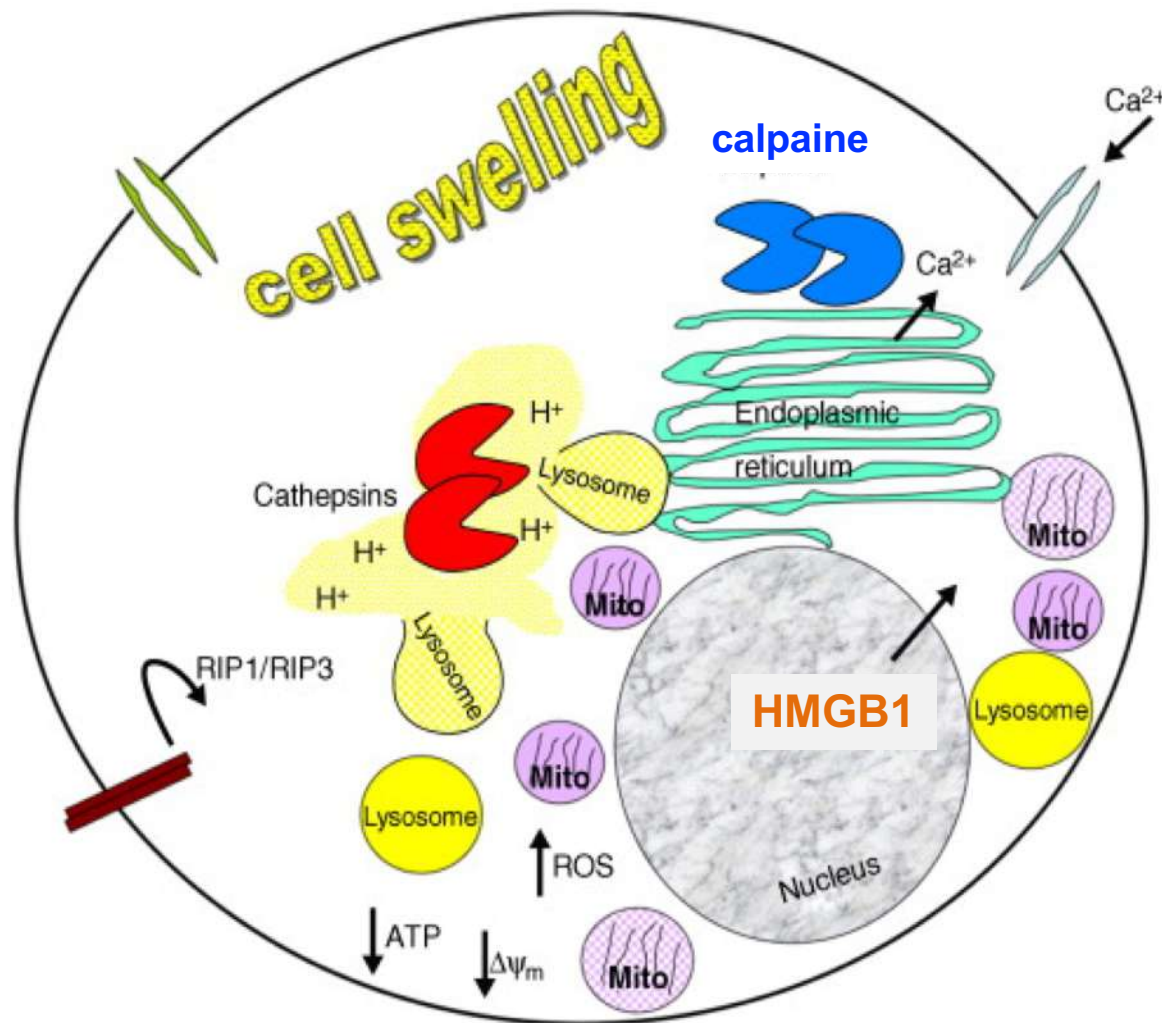


Calpaine: proteasi cisteiniche non lisosomiali calcio-dipendenti

Catepsine: endopeptidasi presenti nei lisosomi

LAMP 2 (Lysosomal associated membrane protein 2)

Eventi cellulari comuni durante la necrosi

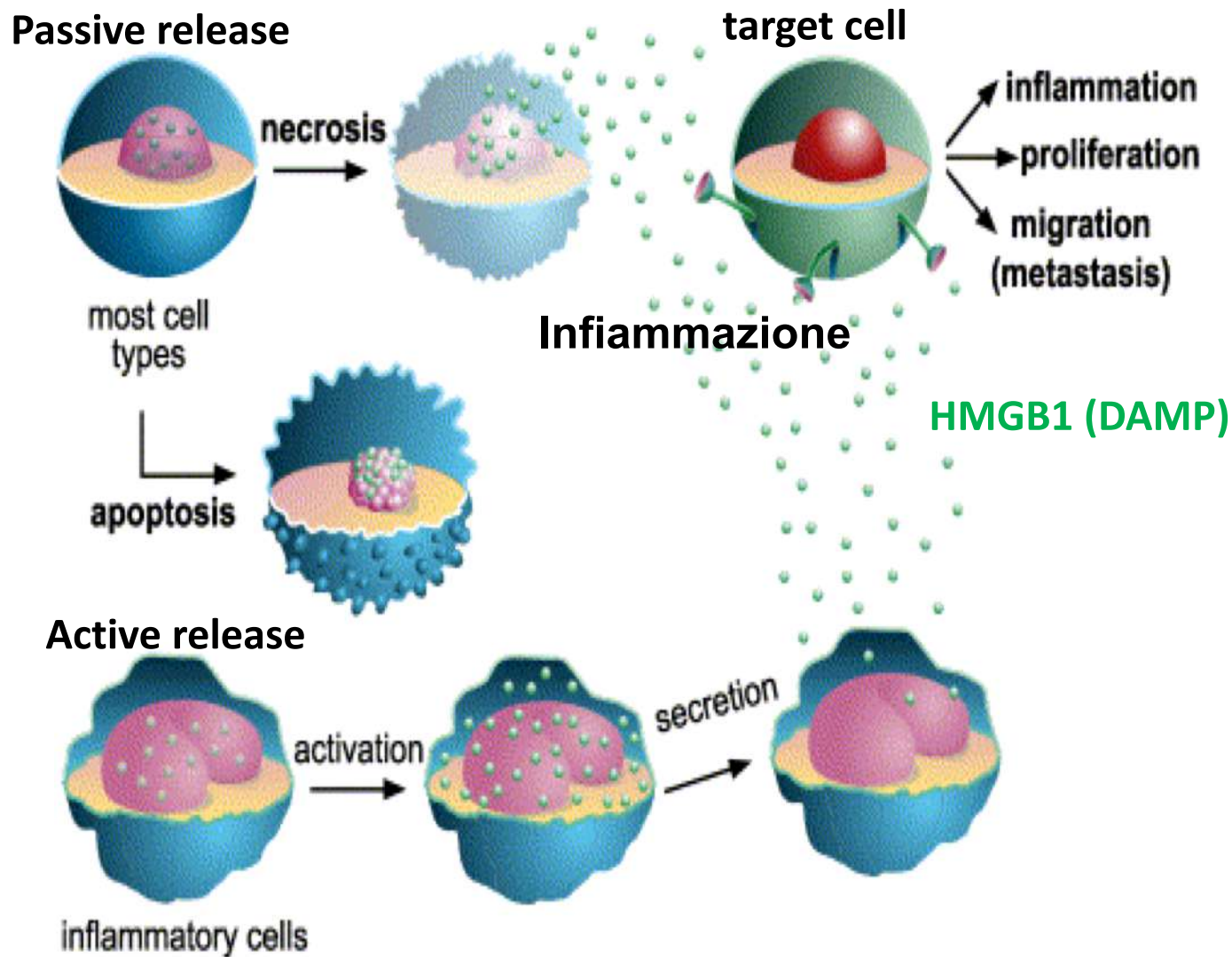


Current Opinion in Cell Biology

In alcuni esempi di necrosi, un aumento del Ca^{2+} citoplasmatico è un evento precoce, che porta all'attivazione di proteasi calcio-dipendenti come le **calpaine**. L'afflusso di Ca^{2+} può provenire da depositi intracellulari o da fonti extracellulari. I mitocondri (rosa) e i lisosomi (gialli) si raggruppano attorno al nucleo (grigio).

L'alterazione della permeabilità mitocondriale induce una perdita del potenziale di membrana ($\Delta\Psi_m$), 'swelling' mitocondriale e rottura. La rottura lisosomiale porta all'acidificazione del citoplasma (H^+) e al rilascio di catepsine. La fuoriuscita dal nucleo della proteina **HMGB1** è stata segnalata nel lievito e nei mammiferi. Molte cellule necrotiche mostrano rottura della membrana plasmatica.

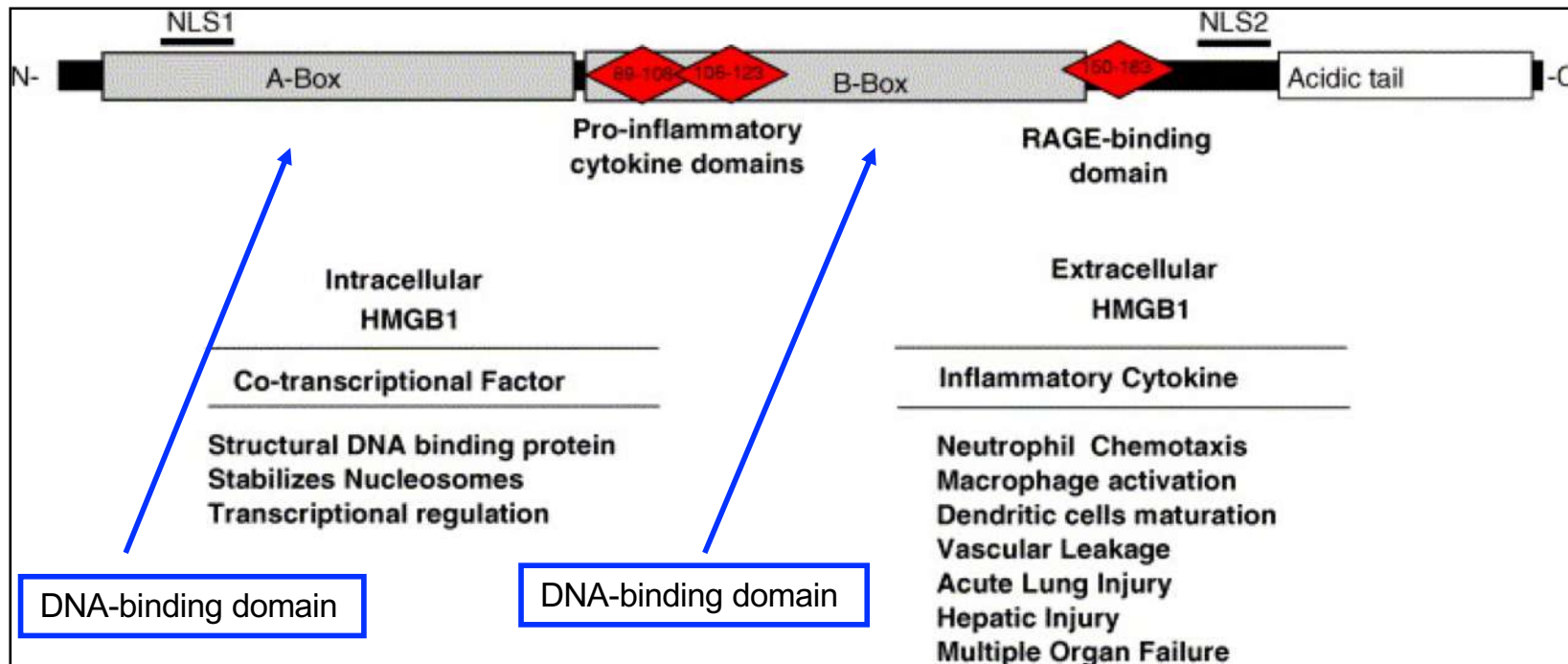
Le cellule in necrosi rilasciano HMGB1



HMGB1 un mediatore fondamentale dell'infiammazione, particolarmente in caso di necrosi

DAMP = profilo molecolare associato al danno

High Mobility Group B1 (HMGB1)



HMGB1 è una proteina nucleare che lega il DNA in modo non sequenza-specifico. Si lega al solco minore del DNA distorcendo l'elica di 90° e rendendo così più facile le interazioni con i complessi multiproteici che servono per molteplici funzioni (trascrizione, replicazione, ricombinazione VDJ etc). Lega i nucleosomi, ma diversamente dall'istone H1 che li blocca in sede, HMGB1 ne favorisce lo slittamento e la mobilità.

Fu una vera sorpresa scoprire che HMGB1 fosse secreta dai monociti e macrofagi e rilasciata dalle cellule necrotiche funzionando come una proteina pro-infiammatoria. Infatti cellule necrotiche derivate da topi HMGB1^{-/-} inducevano un'infiammazione debole rispetto ai topi wt.

Nel caso di cellule apoptotiche, la cromatina collassa in uno stato condensato che non permette il distacco di HMGB1 e quindi non c'è rilascio di HMGB1 e infiammazione.

Apoptosi

E' indotta da:

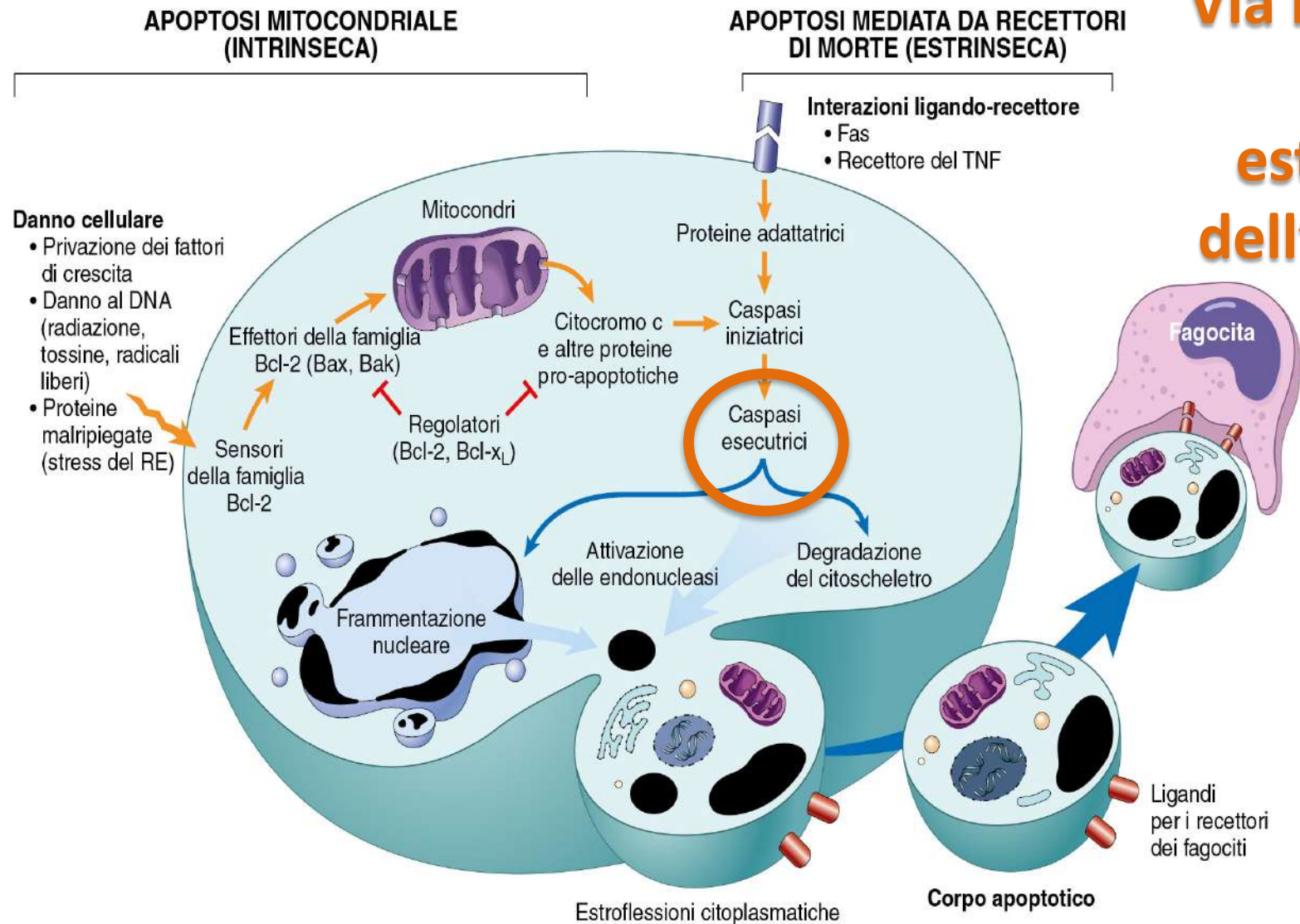
- Recettori di morte, mancanza di fattori di crescita, danni al DNA, accumulo di proteine malripiegate, infezioni virali, radiazioni, agenti chemioterapici.
- **Coinvolta in molti processi fisiologici:**
embriogenesi, differenziamento, omeostasi, involuzione tessuti ormone-dipendente, turnover cellulare, invecchiamento, rimozioni di cellule con danno al DNA o di cellule pericolose/difettose.
- **Anche coinvolta in eventi patologici:**
malattie neurodegenerative, immunodeficienze, malattie autoimmuni e tumori.

Apoptosi è un forma altruistica di suicidio cellulare

Negli organismi multicellulari, le singole cellule muoiono quando condizioni intrinseche o estrinseche inducono condizioni tali che esse si “sentono” come potenzialmente dannose per l'intero organismo.

(e.g.: danno al DNA, attivazione degli oncogeni, stimolazione di recettori di morte.....)

Via intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi



Le due vie di induzione dell'apoptosi differiscono nei meccanismi di attivazione e regolazione, ma convergono nell'attivazione delle **caspasi**. Nella via mitocondriale, lo sbilanciamento nelle proteine della famiglia Bcl-2, che regolano la permeabilità mitocondriale, causa la fuoriuscita di varie sostanze dai mitocondri, attivando le caspasi. Nell'apoptosi indotta dai recettori di morte, l'attivazione di recettori presenti sulla membrana plasmatica induce il reclutamento di proteine adattatrici per assemblare complessi che trasducono segnali di morte, attivando le caspasi, con lo stesso risultato finale.

Attivazione del macchinario apoptotico

Pathway estrinseco

Legame dei ligandi specifici:

-**TNF** - **FasL** -**TRAIL** etc

ai rispettivi recettori di morte, membri della famiglia del TNFR:

-**TNFR1** - **Fas** -**TRAILR*** etc

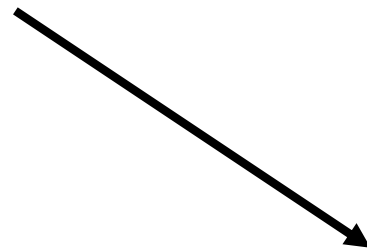


Formazione del **DISC**

(Death-Inducing Signaling Complex)
dopo reclutamento di molecole adattatrici (es. **FADD** e **TRADD**) e delle pro-caspasi 8 (o 10)

* **Recettori di morte:**

- **TNFR1**
- **Fas**
- **DR3**
- **TRAILR**
- **DR5**
- **DR6**



Pathway intrinseco

"Stress or danger/damage conditions"



(sensori interni)

ad esempio **ATR; ATM** → **p53**

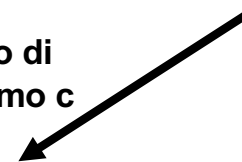


Propagazione del segnale attraverso i membri proapoptotici della famiglia Bcl-2
(**Bid; Bad; Noxa; Puma; Bim** → **Bax; Bak**)



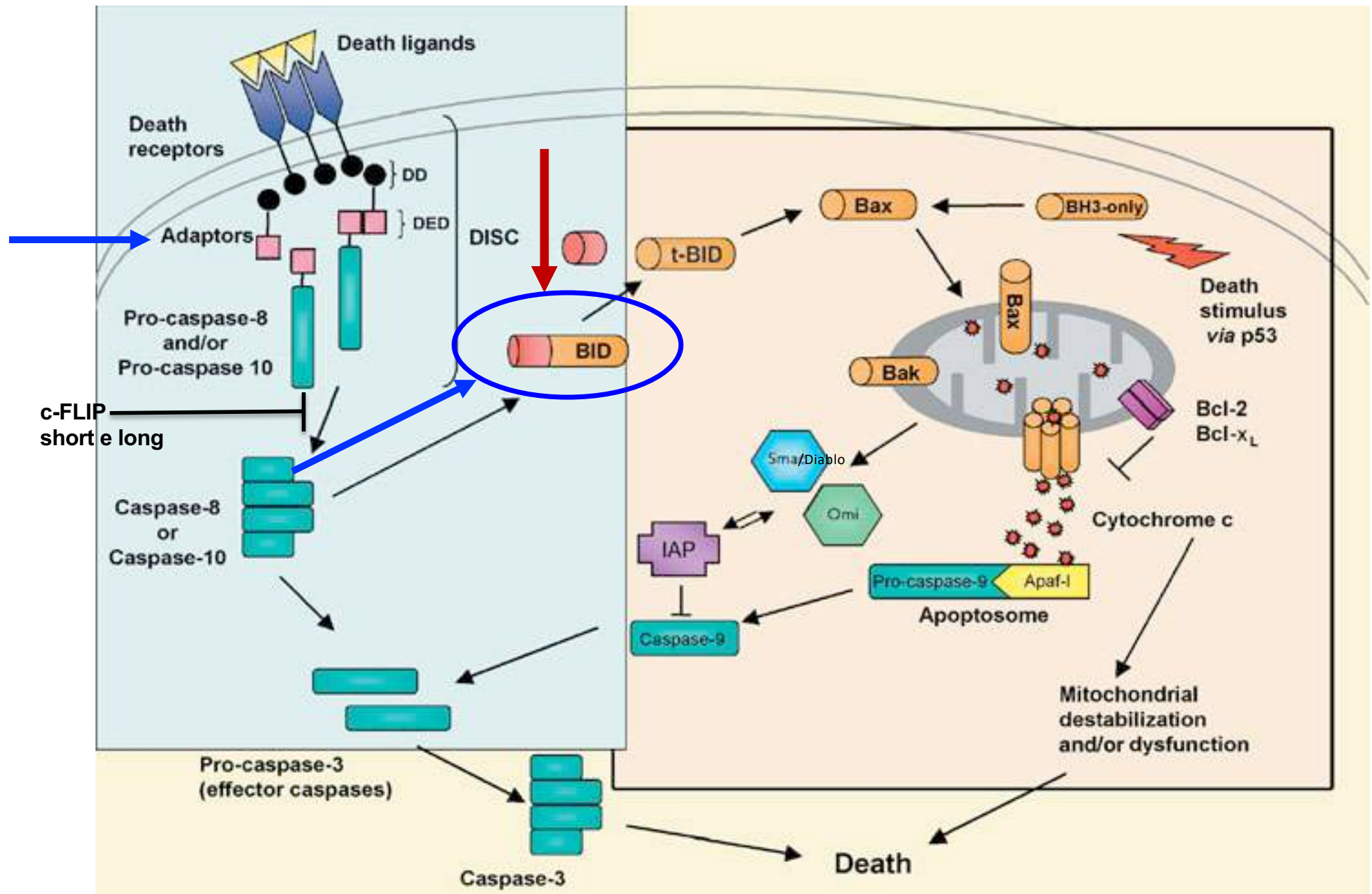
Aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna

rilascio di
citocromo c



**Attivazione delle caspasi iniziatrici
e poi delle caspasi effettrici**

Pathways molecolari dell'apoptosi



(attivazione di ICAD/CAD)

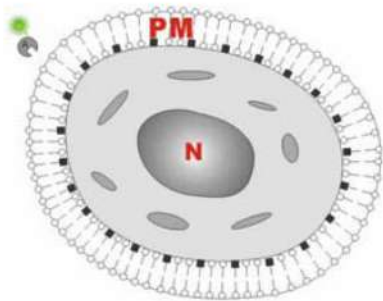
Caratteristiche biochimiche dell'apoptosi

- Esposizione della fosfatidilserina sulla superficie cellulare
- Frammentazione endonucleosomica del DNA genomico
- Taglio proteolitico del citoscheletro
- Taglio proteolitico di proteine nucleari

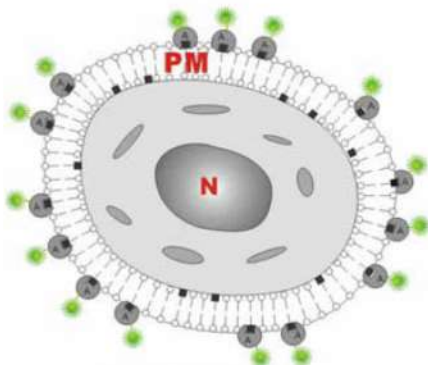
Esposizione in membrana della fosfatidilserina è un evento apoptotico precoce

Metodo di rilevazione: **colorazione della membrana plasmatica con Annessina V che lega specificamente la fosfatidilserina**

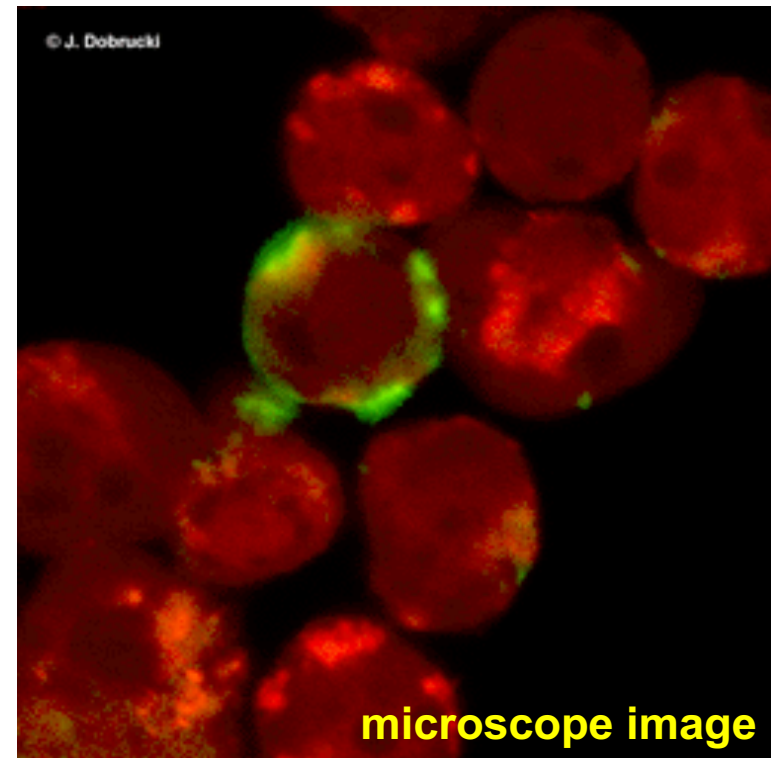
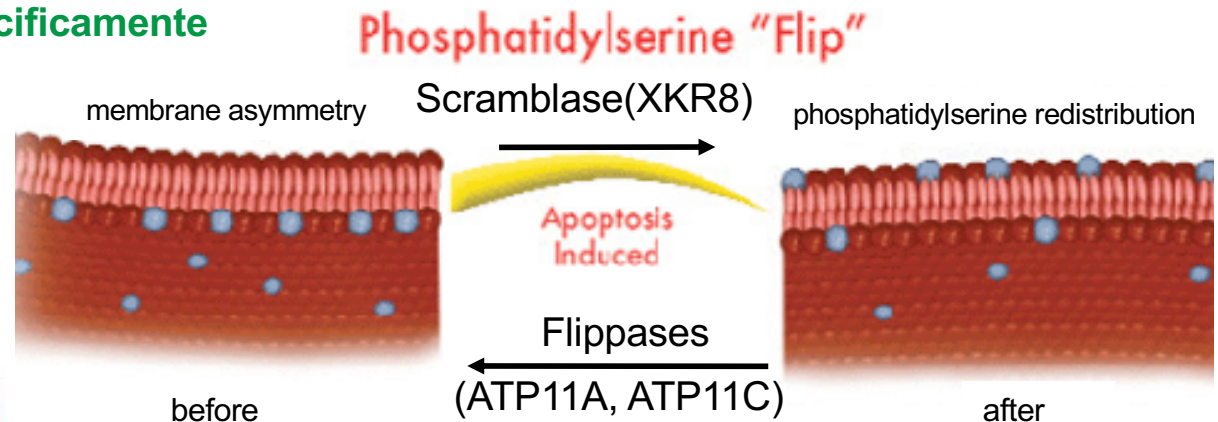
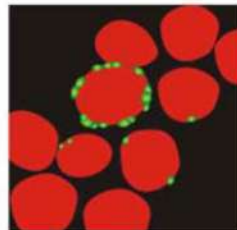
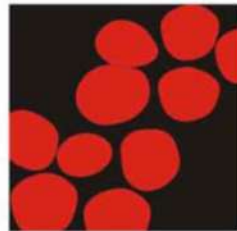
Phospholipid
Phosphatidylserine
Annexin with a green fluorescent label



Normal, healthy cell

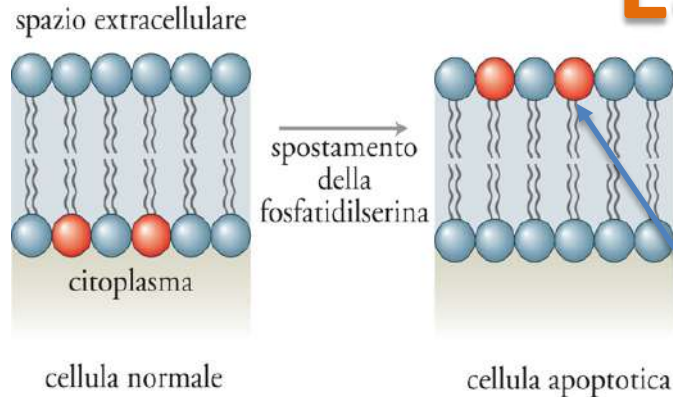


Apoptotic cell

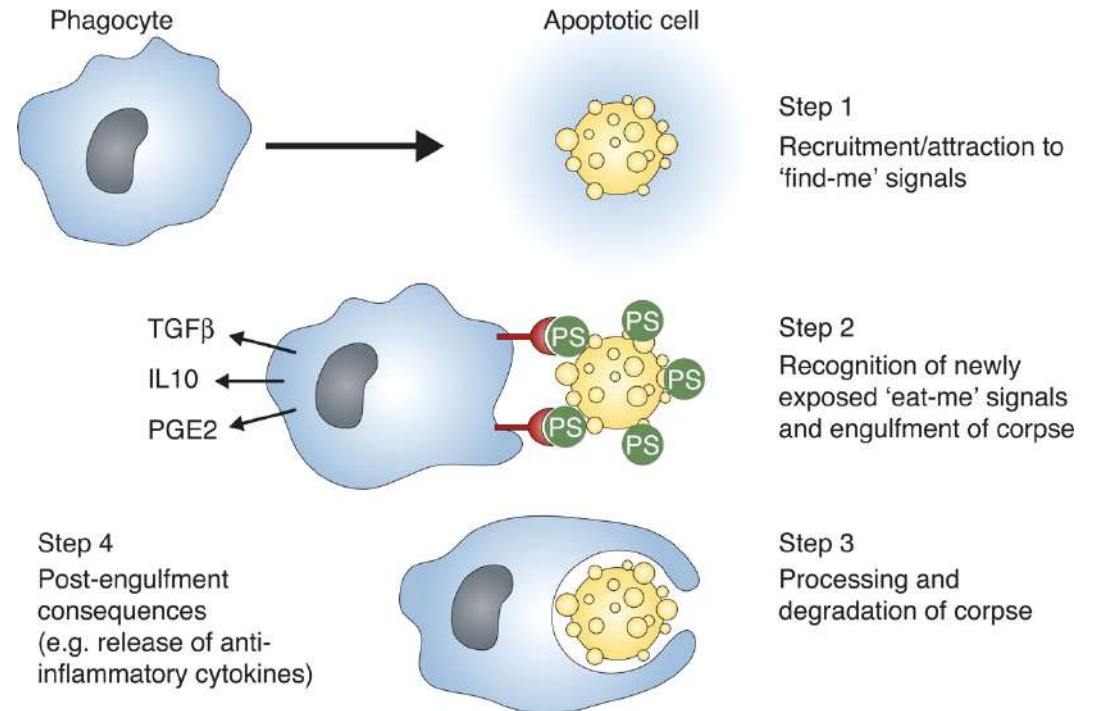


microscope image

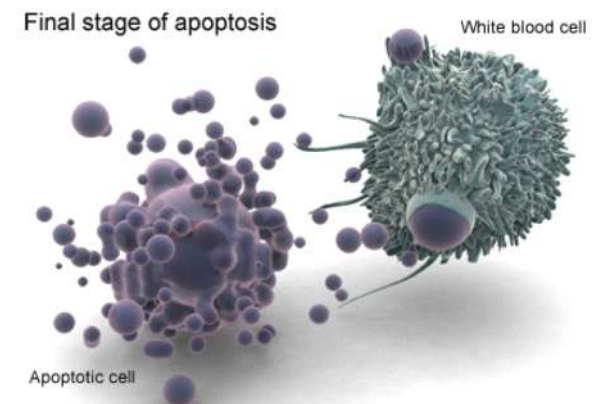
Eat me signals



Le variazioni di membrana portano all'esposizione della **fosfatidilserina (PS)** che viene riconosciuta dai fagociti come **“eat me signal”**.



Diversi steps sono coinvolti nell'eliminazione efficiente delle cellule apoptotiche. I **segnali find-me (come i nucleotidi ATP e UTP)** rilasciati dalle cellule apoptotiche aiutano ad attrarre fagociti mobili in prossimità della cellula che subisce l'apoptosi. I fagociti quindi utilizzano i recettori specifici sulla loro superficie che ingaggiano i **segnali eat-me (es. fosfatidilserina)** sulle cellule apoptotiche. È stato dimostrato che il coinvolgimento dei recettori di “engulfment” stimola il rilascio di citochine anti-infiammatorie come TGF- β , IL-10 e prostaglandina E2 (PGE2). La segnalazione intracellulare indotta dalle interazioni ligando-recettore nel fagocita porta a riarrangiamenti citoscheletrici e internalizzazione della cellula morente. Il fagocita elabora i corpi apoptotici internalizzati attraverso una serie di passaggi e una corretta digestione sembra essere importante per il continuo “inghiottimento” di altre cellule morenti da parte dei fagociti.



Caspasi: esecutori centrali del programma di morte

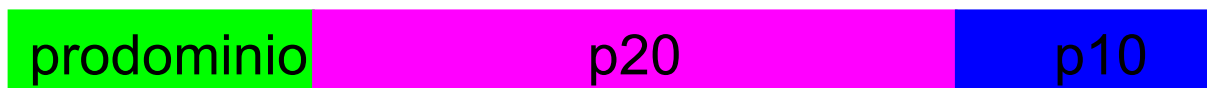
sono proteasi cisteiniche altamente conservate (distinte in **iniziatrici**/attivatrici e **effettrici**/esecutrici) 13 membri identificati nell'uomo

Riconoscono sequenze del tipo:

	P4	P3	P2	P1	TAGLIO DEL SUBSTRATO
Gruppo I	idrofobico			Asp	1; 4; 5;
Gruppo II	Asp	Glu	X	Asp	2; 3; 7
Gruppo III	alifatico			Asp	6; 8; 9; 10

sono raggruppate per la specificità del substrato, similitudine di sequenza e omologia strutturale.

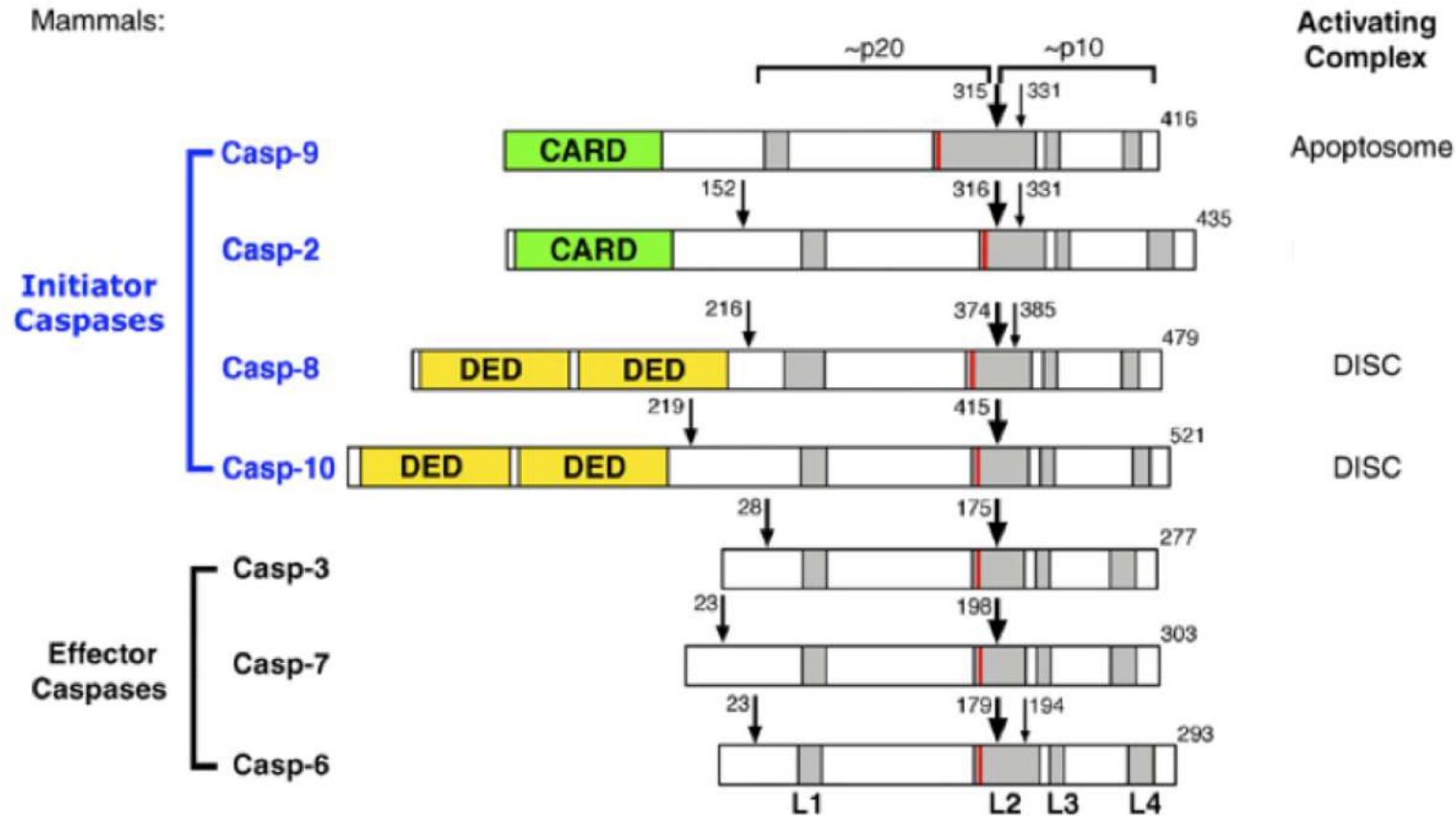
Sono sintetizzate come zimogeni (proenzimi inattivi) composti da tre domini:



La forma matura è un eterotetramero (2 p20/p10)

Caspasi apoptotiche

Mammals:

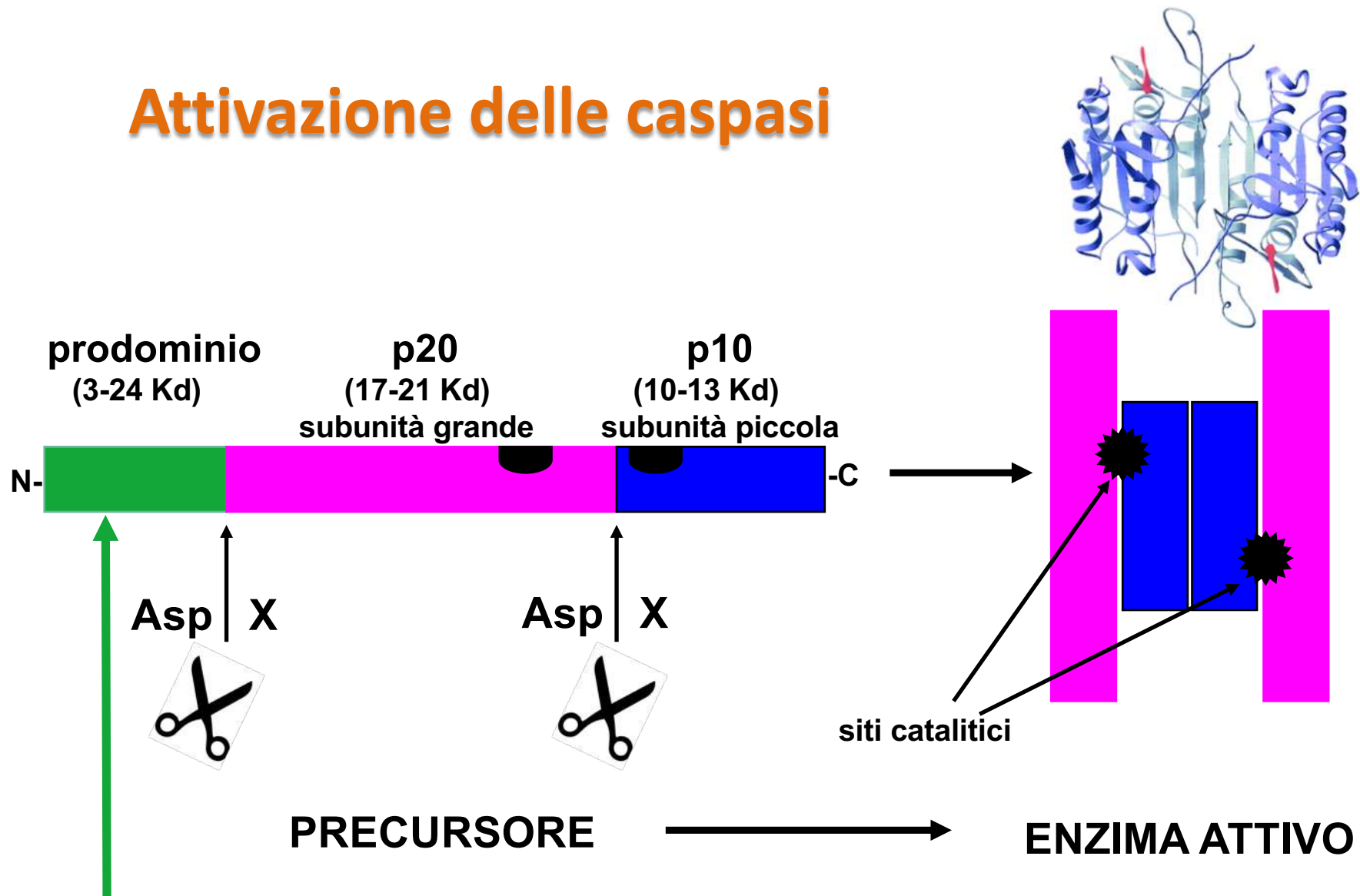


Caspasi iniziatrici: Casp-9, Casp-2, Casp-8 e Casp-10

CARD e **DED** =domini di reclutamento all'N-terminale delle caspasi iniziatrici

Caspasi effettrici: Casp-3, 6 e 7

Attivazione delle caspasi

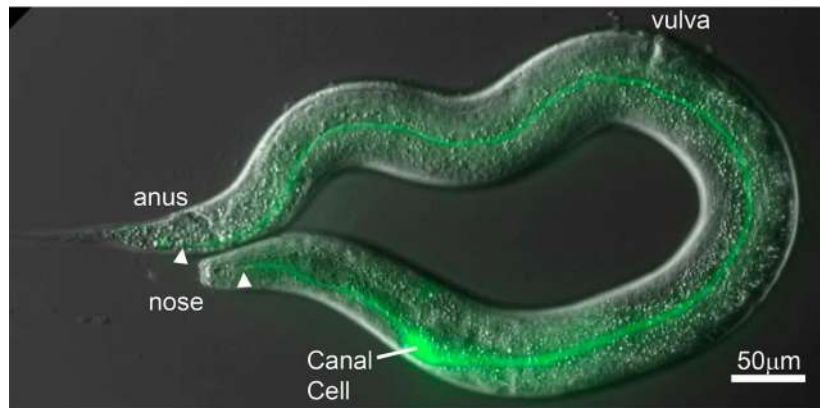


Modulo per l'interazione proteina-proteina (dominio di reclutamento)

DED=death effector domain (caspasi 8 e 10)

CARD=caspase activation and recruitment domain (caspasi 2 e 9)

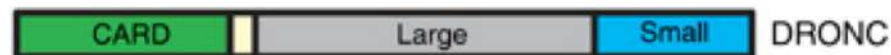
Le caspasi attivatrici ed effettrici in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* e nei mammiferi



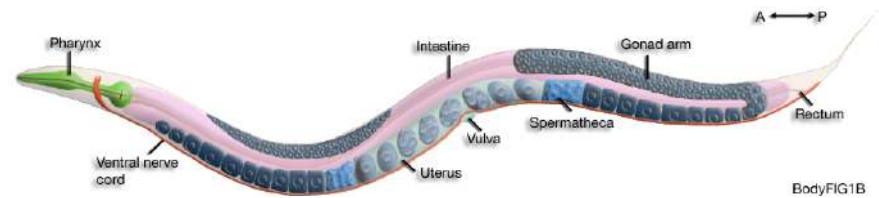
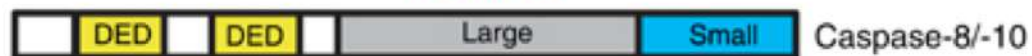
C. elegans



Drosophila



Mammals



BodyFIG1B

	Zygote					
	AB	MS	E	C	D	P4
	Ectoderm	mesoderm	gut	misc	muscle	germ cells
	Nervous system	muscle	endoderm			
survivors	606	252	34	47	20	variable
deaths	116	14	0	1	0	variable

CED-4



CED-3



apoptosis



Brenner S,



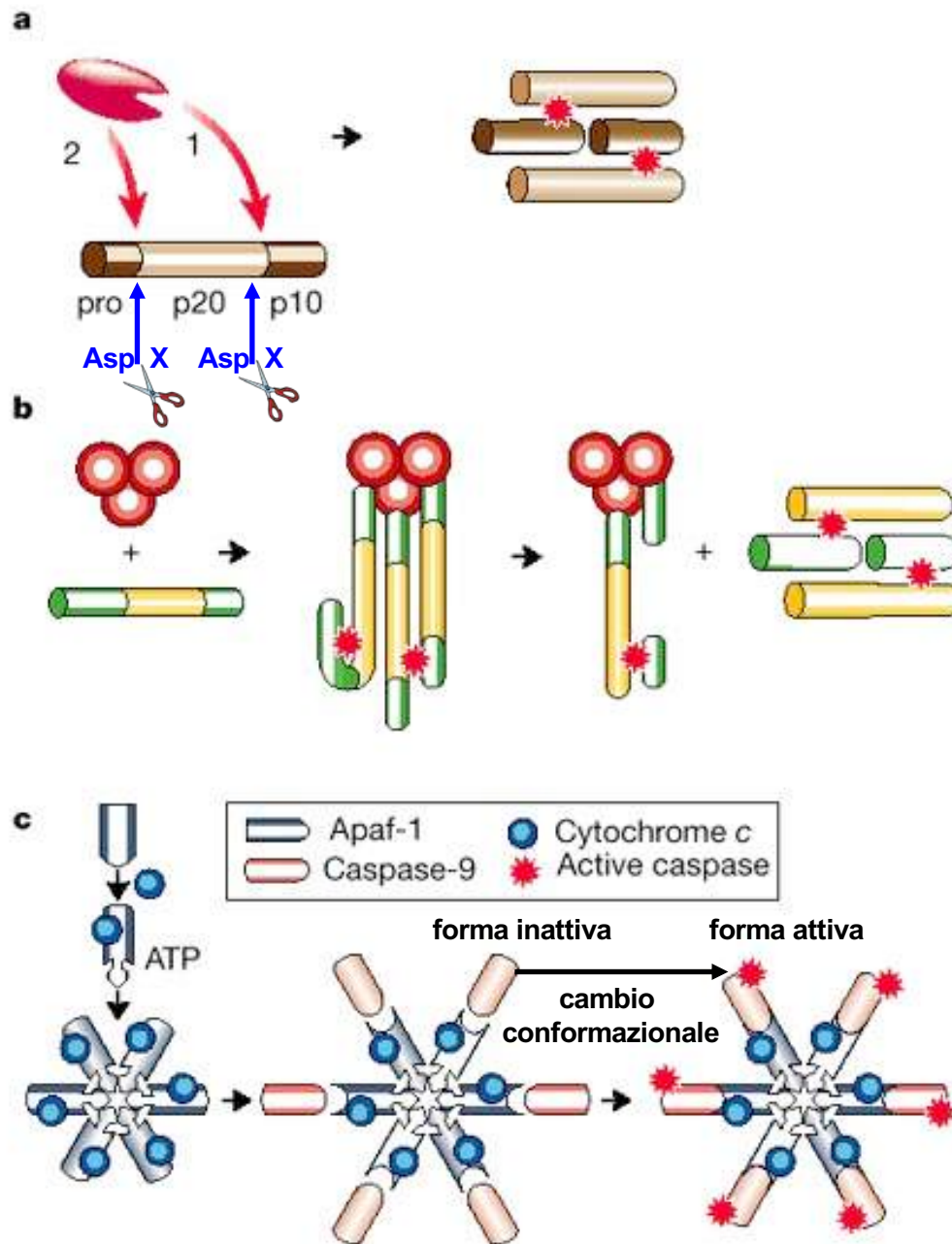
Sulston J,



Horvitz HR

Nobel prize in Physiology or Medicine 2002

Meccanismi di attivazione delle caspasi



a) **Proteolisi da parte di caspasi o granzimi B :**
meccanismo di attivazione delle caspasi effettrici 3, 6, 7

b) **Attivazione autocatalitica:**
meccanismo delle caspasi 8 e 2

c) **Formazione di un apoptosoma:**
meccanismo di attivazione della caspasi 9

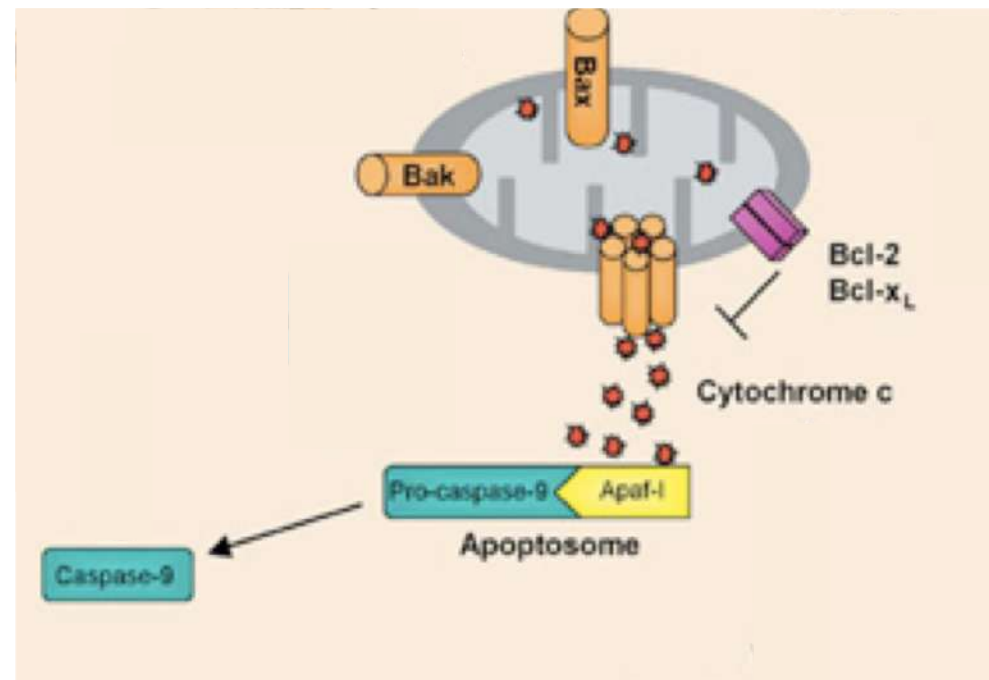
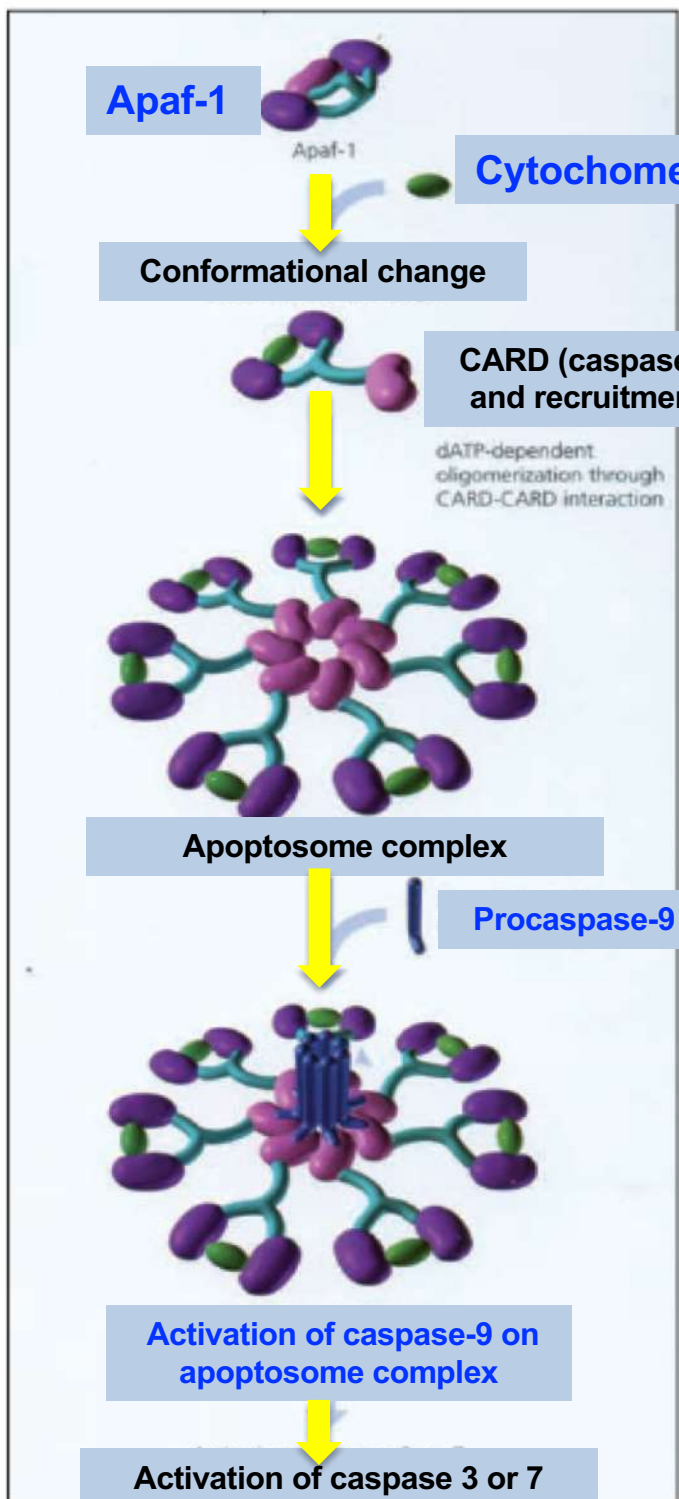
apoptosoma

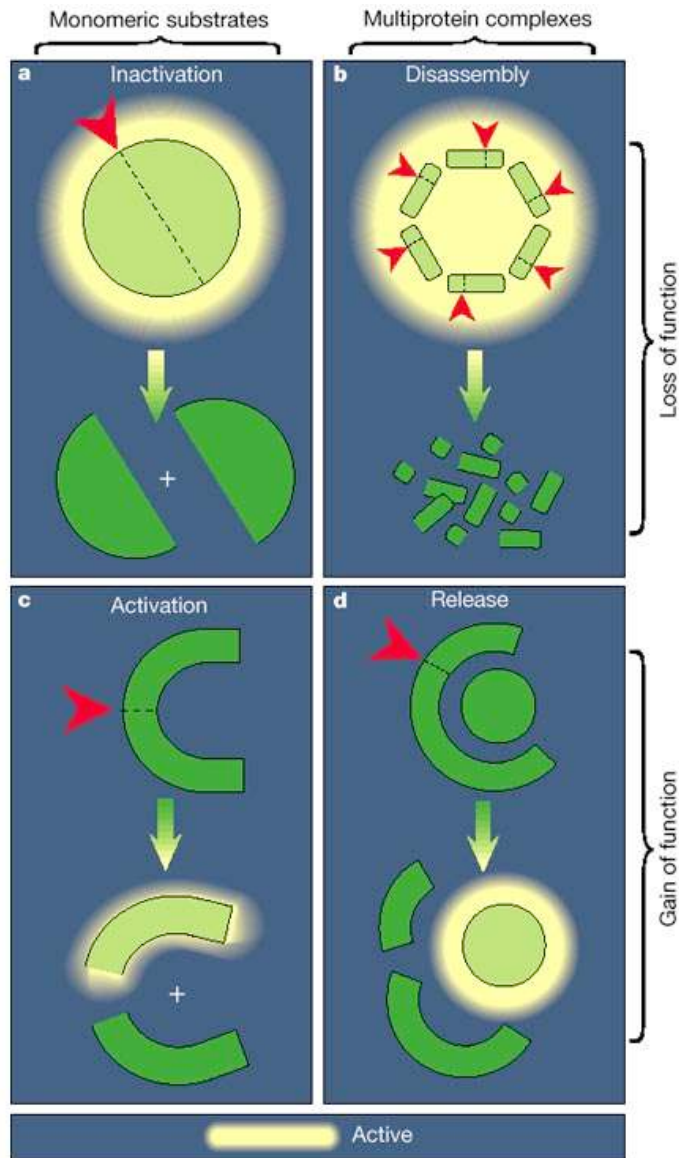
Processo di formazione dell'apoptosoma ed attivazione della caspasi 9

Il **Citocromo c** che fuoriesce dal mitocondrio lega nel citosol **APAF1** monomerico ed induce la sua oligomerizzazione in una struttura simile ad una ruota eptamerica chiamata apoptosoma

L'apoptosoma recluta ed attiva la **pro-caspasi 9**
> **caspasi 9**

La caspasi 9 attiva le **caspasi esecutrici 3 e 7**





Esiti dell'azione delle caspasi: attivazione o inattivazione

La scissione proteolitica indotta dalle caspasi può portare a risultati diversi, a seconda della natura del substrato e dell'esatta posizione del sito di scissione nella sequenza primaria. Il risultato più semplice e più frequente è la perdita di attività biologica (pannelli a, b). I substrati della caspasi vanno da enzimi a catena polipeptidica singola (es. **poli ADP-ribosio polimerasi**) a strutture macromolecolari complesse (ad esempio, la **lamina nucleare**). La proteolisi limitata delle caspasi può anche comportare un aumento dell'attività biologica (c, d). In alcuni casi (es., **Bcl-2** o **Bcl-xL**), i prodotti scissi antagonizzano la proteina intera (forme dominanti negative). In altri casi, la rimozione di domini o subunità inibitorie determina un aumento dell'attività biologica (es., **Bid** e **CAD/ICAD**).

Caspasi 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 sono principalmente coinvolte nell'apoptosi.

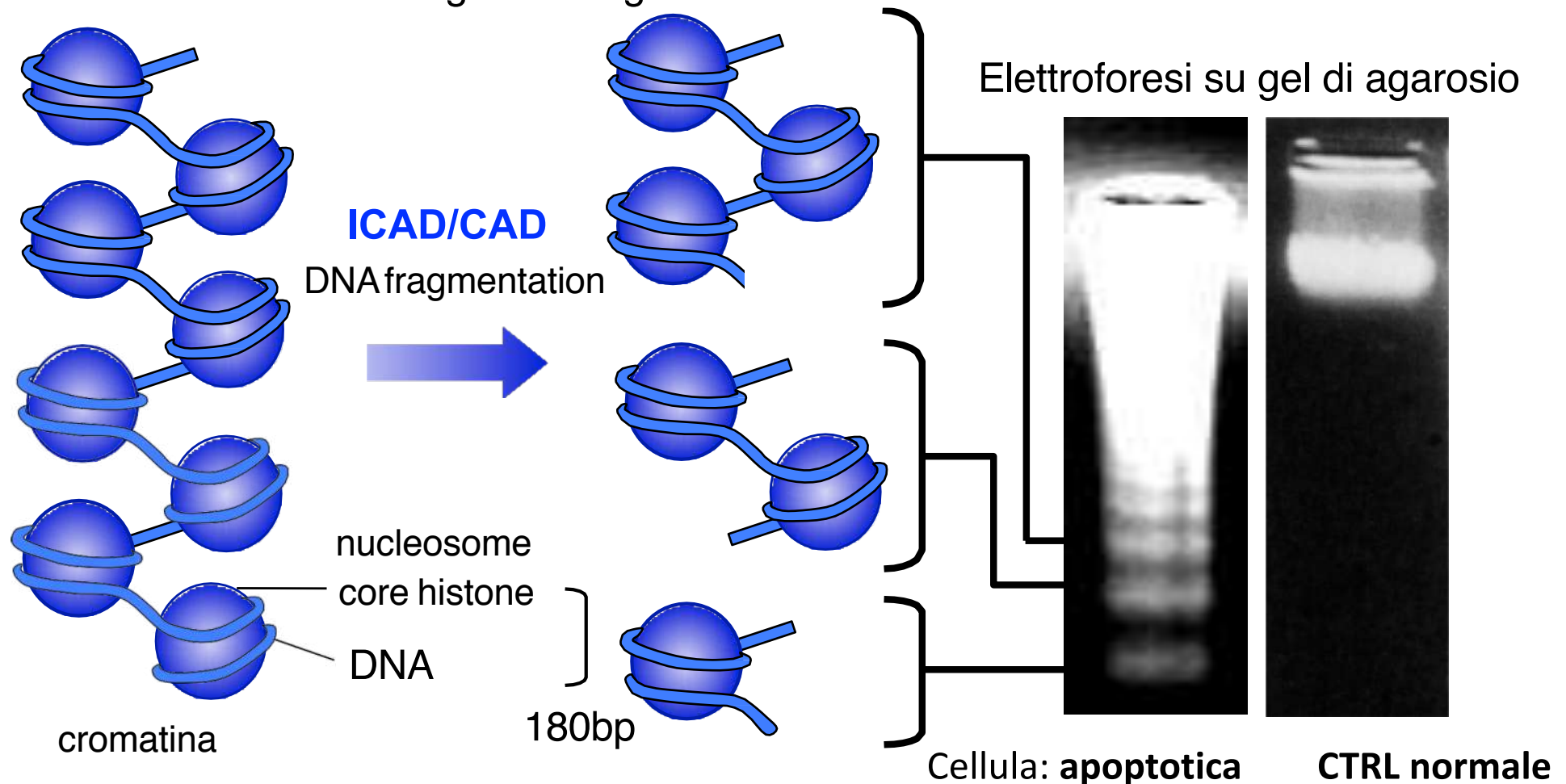
Caspasi 1, 4, 5, 13, 14 hanno un ruolo primario nel processamento delle citochine durante l'infiammazione e in altri processi.

Taglio del DNA nella regione inter-nucleosomale

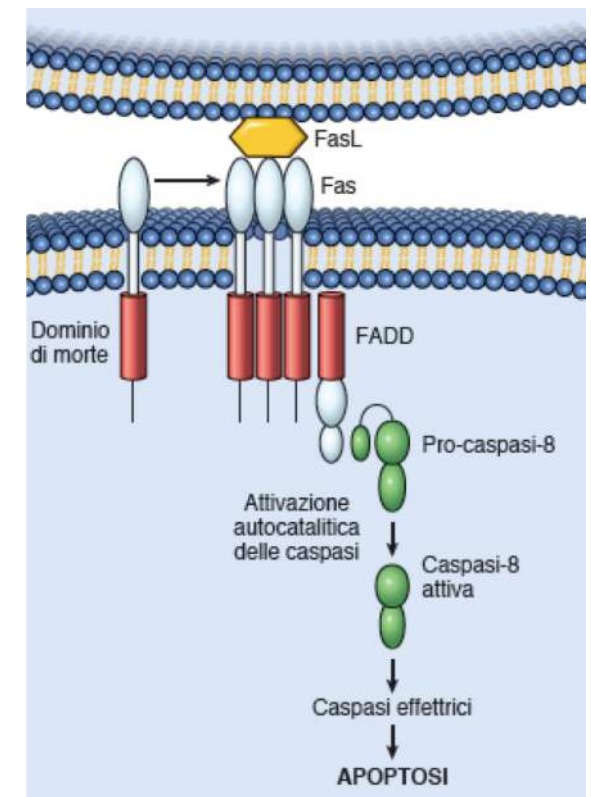
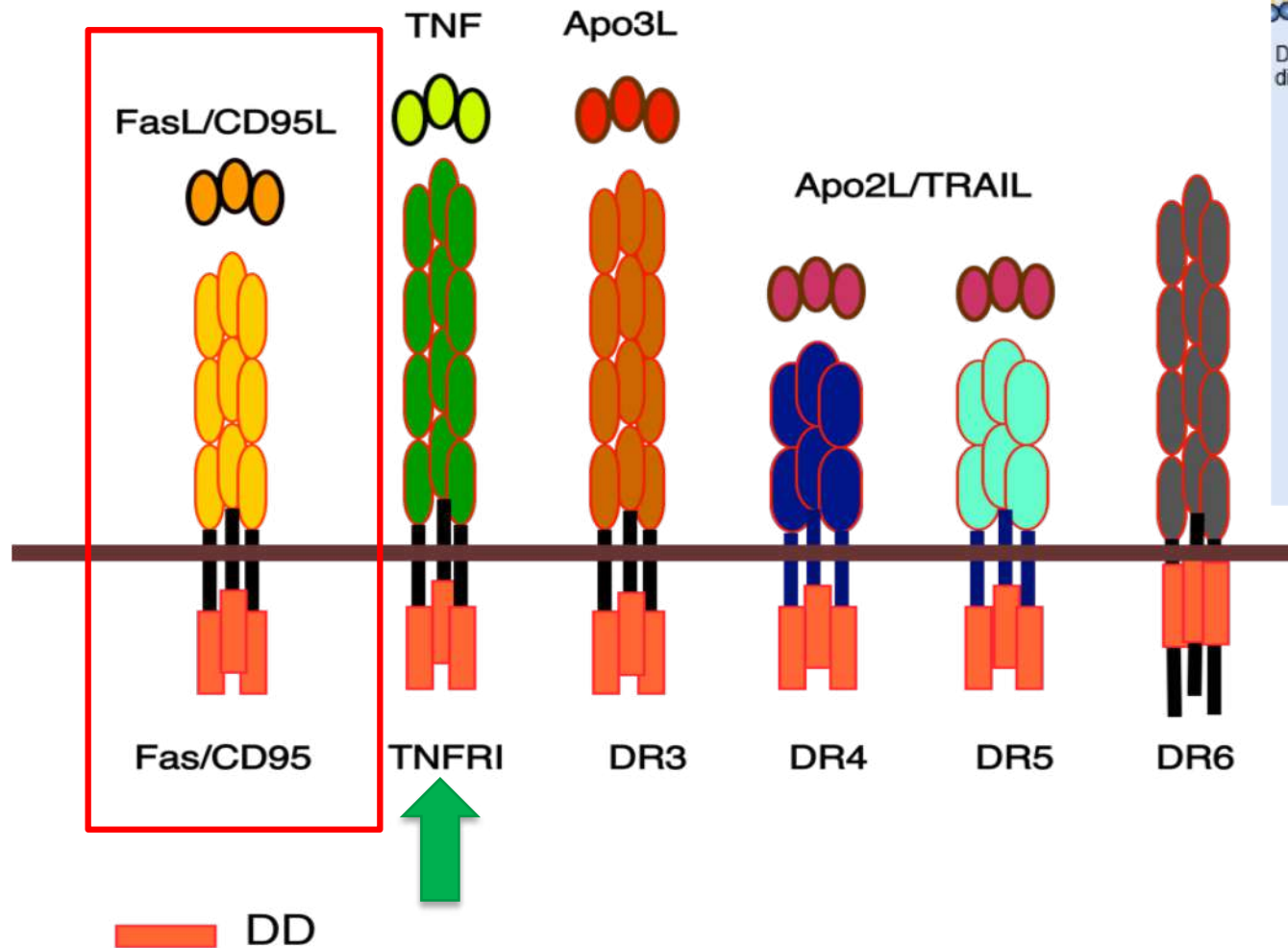
Frammentazione caratteristica del DNA nelle cellule apoptotiche

Nelle cellule apoptotiche il DNA viene visualizzato come un ladder (scaletta) di 180-200 bp a causa della scissione del DNA nelle regioni inter-nucleosomiche.

Si attivano endonucleasi endogene in particolare **CAD (DNasi attivata dalla caspasi 3)** in seguito al taglio della subunità inibitoria ICAD



Death receptors (recettori di morte)



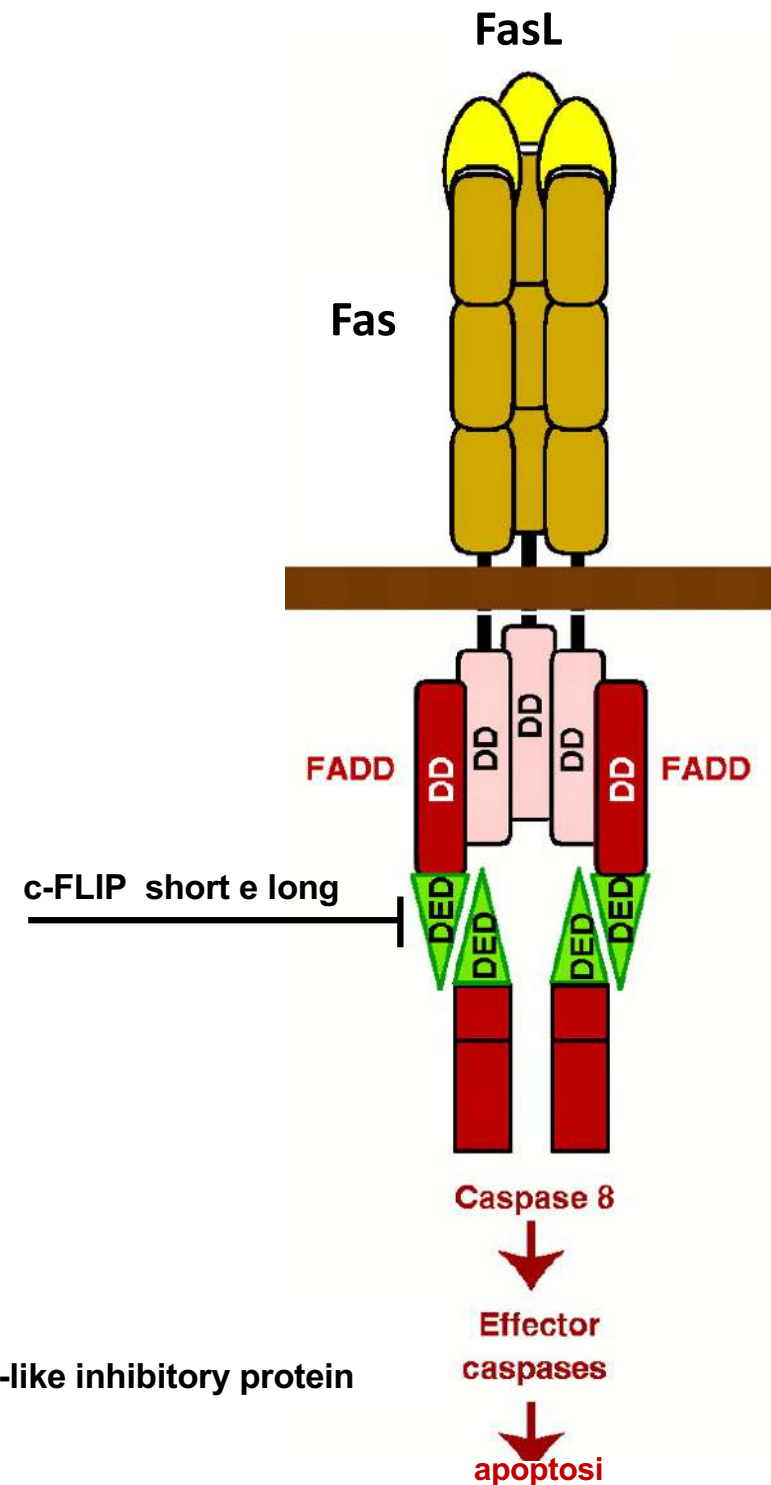
FasL: espresso dai linfociti Th1, linfociti T citotossici (CTL) e cellule NK

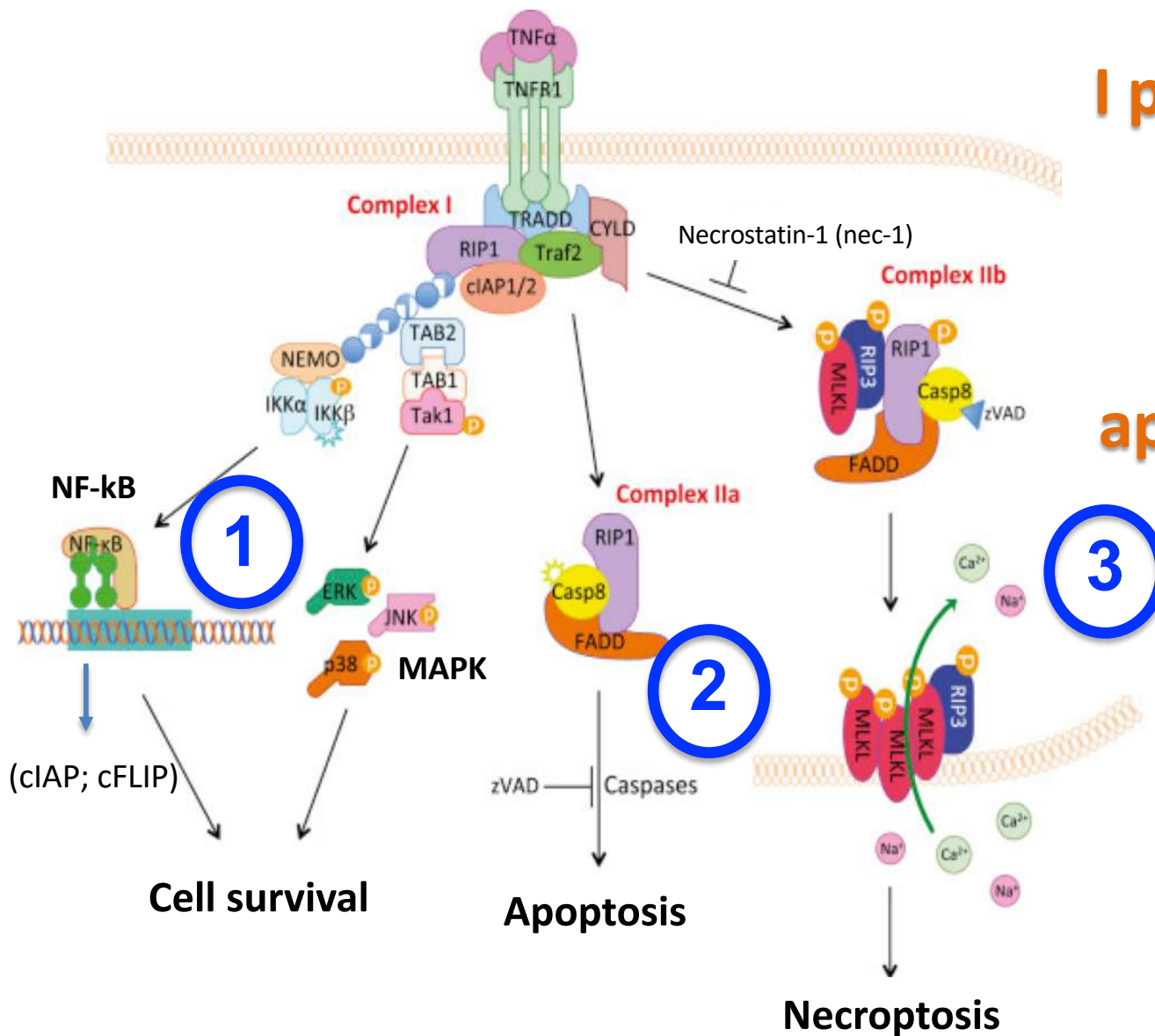
Fas: espresso da molti tipi cellulari in diversi tessuti

Death receptor

(recettore di morte)

- Segnali esterni propagati dai recettori di morte (DR) per esempio Fas (CD95)
- Ogni trimero FasL si lega a 3 Fas portando al clustering dei DD.
- FADD (dominio di morte associato a Fas) si lega tramite il proprio DD al DD del recettore
- L'oligomerizzazione della caspasi 8 guida l'attivazione attraverso l'autoscissione
- La caspasi 8 quindi attiva le caspasi effettrici a valle
- Inizio dell'apoptosi





I pathways attivati dal TNFR1 possono indurre: sopravvivenza, apoptosi o necroptosi

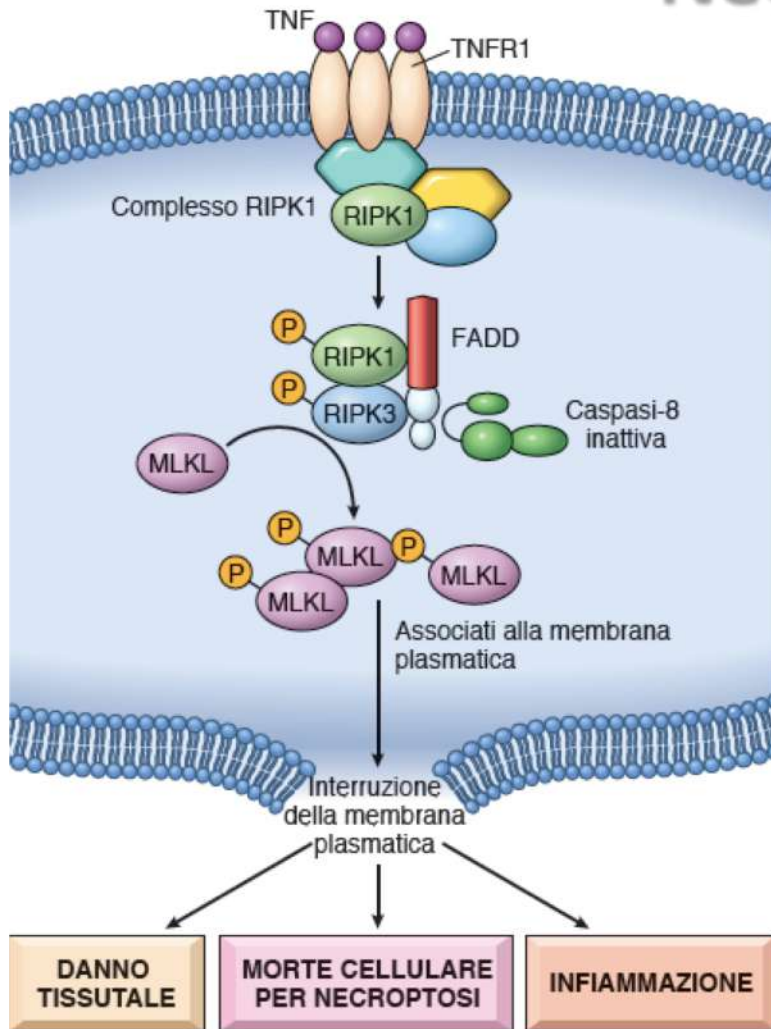
Vie cellulari mediate da TNFR1 di **sopravvivenza** cellulare, **apoptosi** e **necroptosi**. L'associazione di TNFR1 con il trimero di TNFα porta alla formazione del complesso I costituito da TRADD, TRAF2, RIPK1 (RIP) e cIAP a livello della membrana citoplasmatica. La poliubiquitinazione legata a K63 di RIPK1 da parte di cIAP, porta al reclutamento del complesso IKK e TAK1, attivando i pathways di **sopravvivenza** di **NF-κB** e **MAPK**.

In assenza di cIAP1 o cFLIP, RIPK1, FADD e caspase-8 formano il complesso citosolico IIa per attivare la cascata delle caspasi e indurre l'**apoptosi**. In condizioni in cui l'attività della caspasi-8 è inibita, **RIPK1** (RIP1) interagisce con **RIPK3** (RIP3) e **MLKL** per formare il complesso IIb che è coinvolto nella mediazione della **necroptosi**. L'attività chinasi di RIPK1 è essenziale per il complesso IIb ed infatti Nec-1, inibitore della chinasi RIPK1, previene la necroptosi. RIPK3 e MLKL sono fosforilati nel complesso IIb e traslocano alla membrana plasmatica, dove il complesso media la permeabilizzazione della membrana.

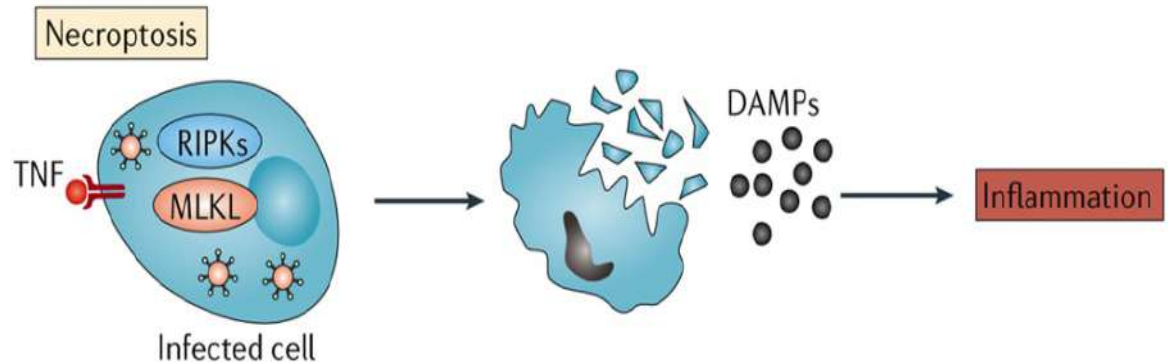
Necroptosi o morte cellulare infiammatoria

Forma di necrosi programmata

Pathway caspasi-indipendente



Necrosis

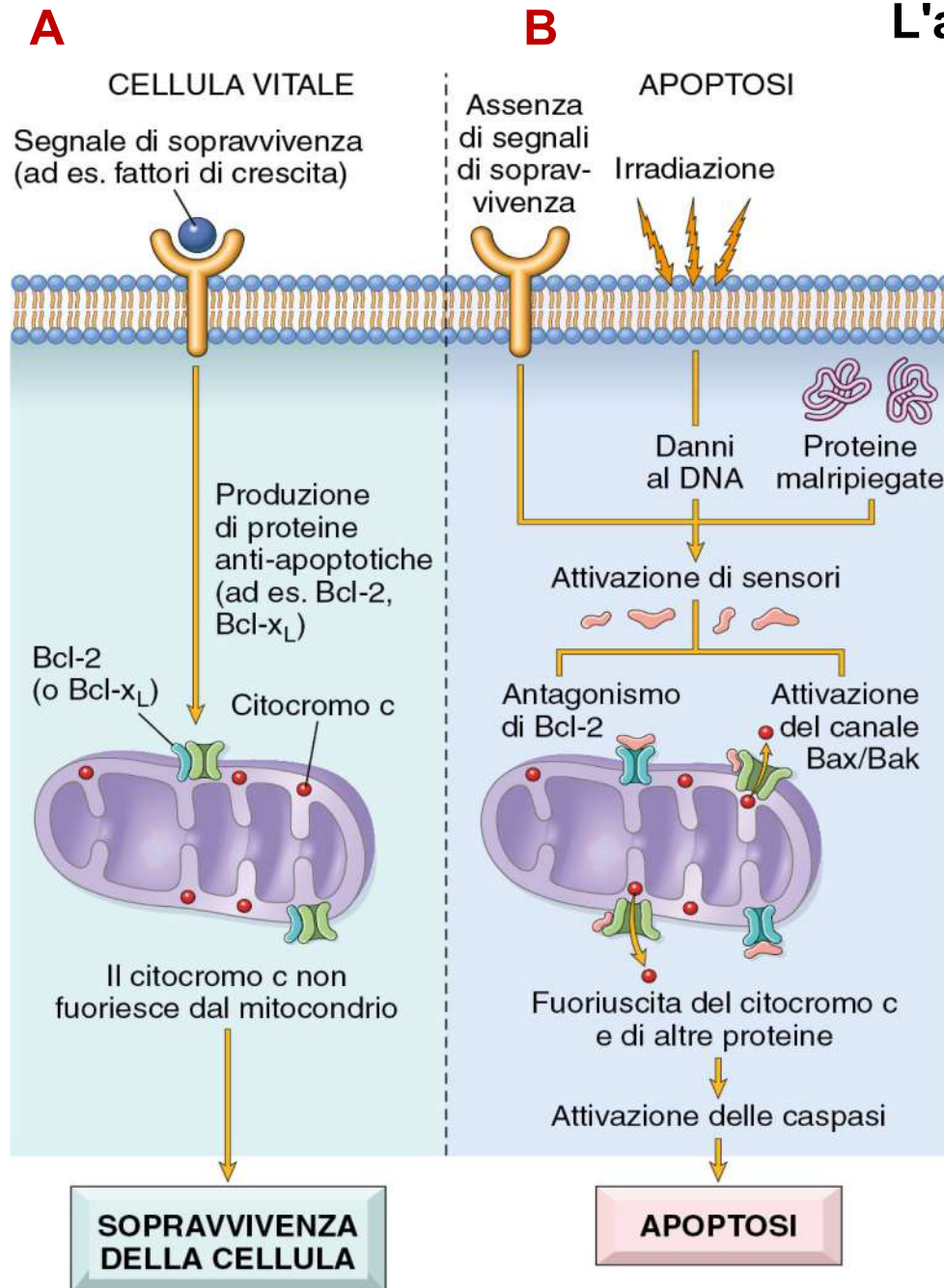


Necroptosi fisiologica = durante il rimodellamento delle cartilagini di accrescimento osseo nei mammiferi.

Necroptosi patologica = danno da ischemia-riperfusione; steatoepatite; aterosclerosi; pancreatite acuta; malattie neurodegenerative (Parkinson); infezioni virali e batteriche; alcuni tumori.

Nella necroptosi, il fattore di necrosi tumorale (TNF) si lega al recettore 1 del TNF (TNFR1) in cellule infettate da virus/batteri o con omeostasi perturbata in specifiche circostanze e attiva le protein chinasi (RIPK1 e 3) che attivate (per auto e transfosforilazione) fosforilano la proteina MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein) che oligomerizza sulla membrana plasmatica danneggiandola e portando al rilascio di profili molecolari associati al danno (DAMP).

Via mitocondriale dell'apoptosi



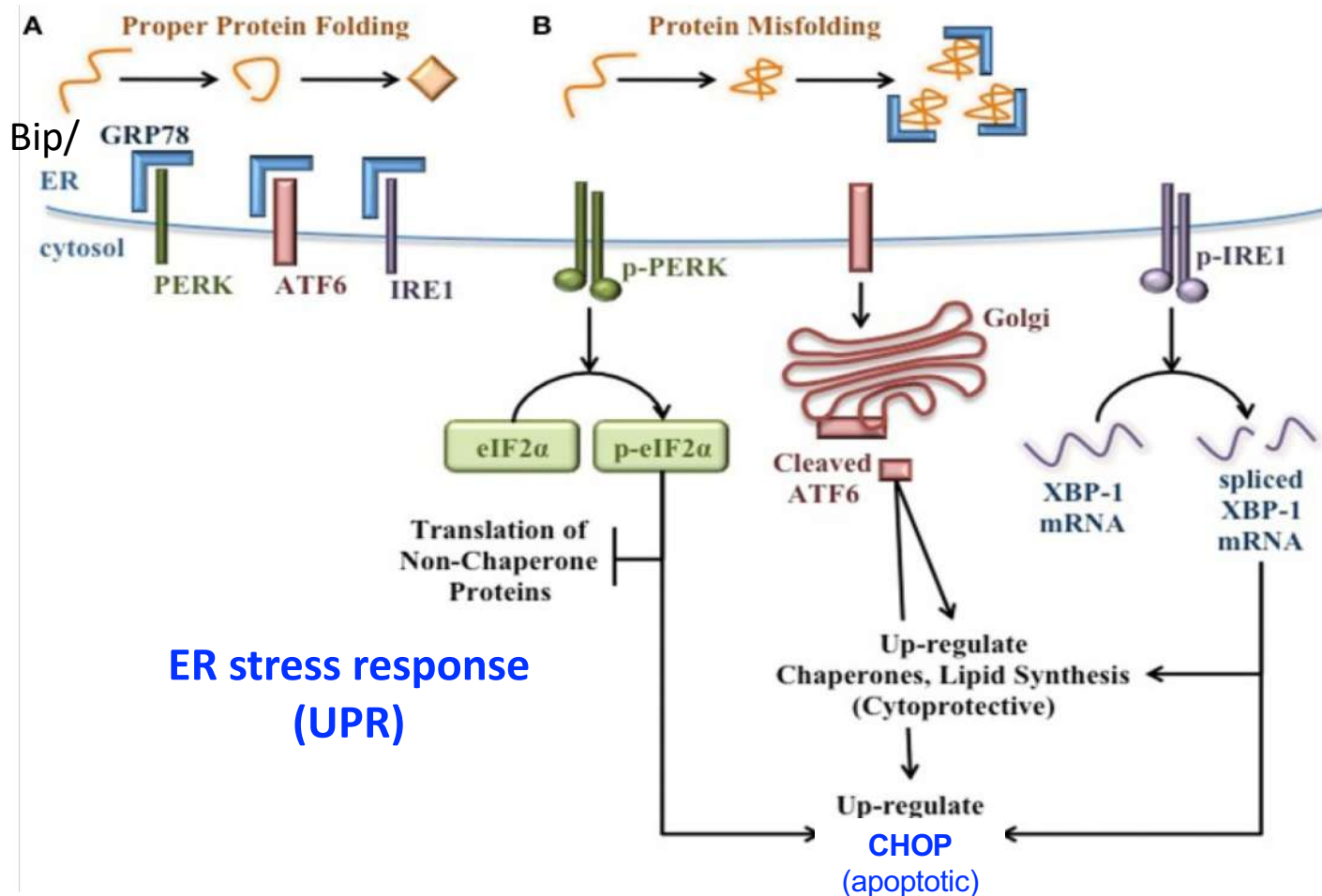
L'attivazione dell'apoptosi mitocondriale dipende dal bilancio tra proteine pro- e anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2.

Le proteine apoptotiche comprendono sensori, che ad esempio, rilevando il danno al DNA attivano l'apoptosi, ed effettori che si inseriscono nella membrana mitocondriale promuovendo la fuoriuscita di proteine mitocondriali.

A. Nelle cellule vitali, le proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2 prevengono la fuoriuscita di proteine mitocondriali.

B. Vari stimoli patogeni attivano i sensori citoplasmatici, inibendo le proteine anti-apoptotiche e stimolando quella pro-apoptotiche; questo causa la fuoriuscita di proteine normalmente sequestrate all'interno dei mitocondri. Le proteine mitocondriali fuoriuscite attivano a catena le caspasi, dapprima le iniziatrici e poi le esecutrici, che causano la frammentazione del DNA della cellula.

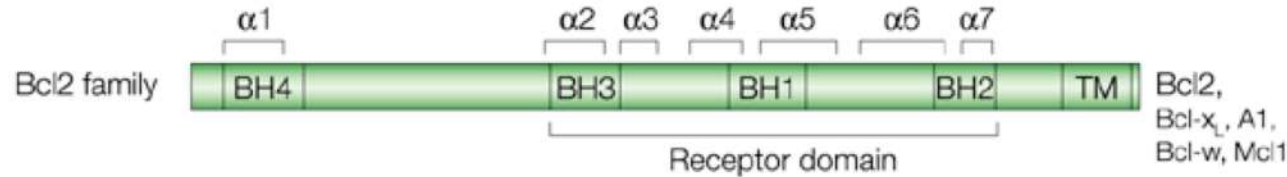
Apoptosi indotta da misfolding delle proteine



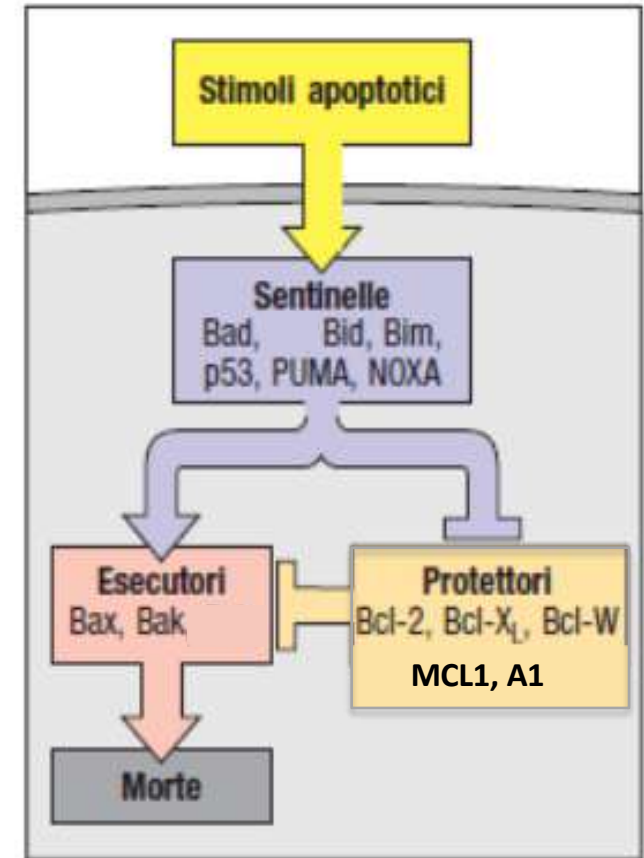
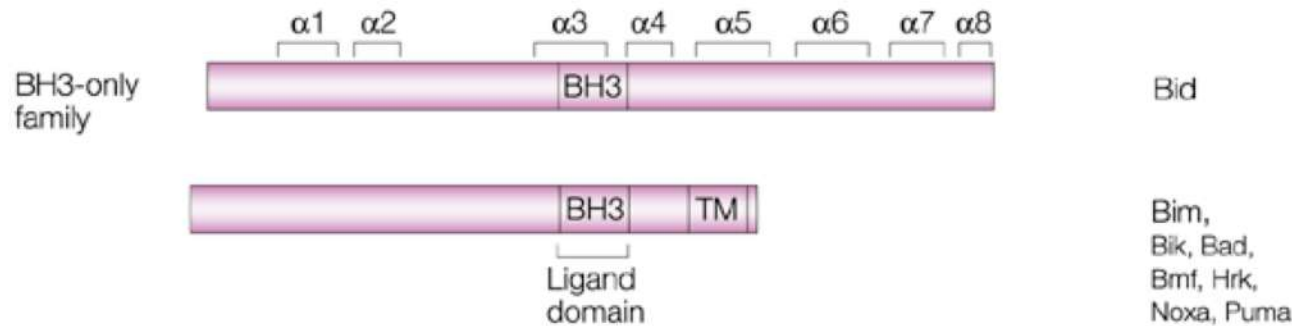
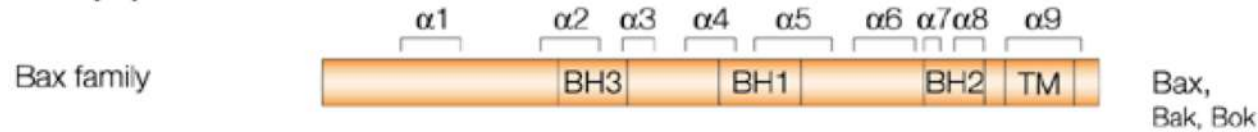
A) Quando il ripiegamento delle proteine è contenuto, i sensori dello stress del RE (PERK, ATF6, and IRE1 α) sono legati e tenuti inattivi da Bip/GRP78. B) Quando le proteine malripiegate si accumulano nel lume del ER, Bip si lega ad esse e rilascia le proteine sensore permettendo l'attivazione della UPR. PERK si autofosforila attivandosi e fosforila eIF2 α lo inattiva e attenua la traduzione di proteine in generale. ATF6 trasloca nel Golgi ed è tagliato per dar luogo ad un fattore di trascrizione che up-regola l'espressione di chaperoni molecolari per aiutare il folding delle proteine accumulate nel ER. IRE1 si autofosforila più tardi in *trans* ed induce lo splicing del mRNA di XBP-1 che può upregolare l'espressione di altre chaperoni per ridurre lo stress del reticolo. **Se lo stress è eccessivo o prolungato, viene indotta l'espressione di proteine pro-apoptotiche come CHOP.**

Memברי della famiglia Bcl-2

Pro-survival



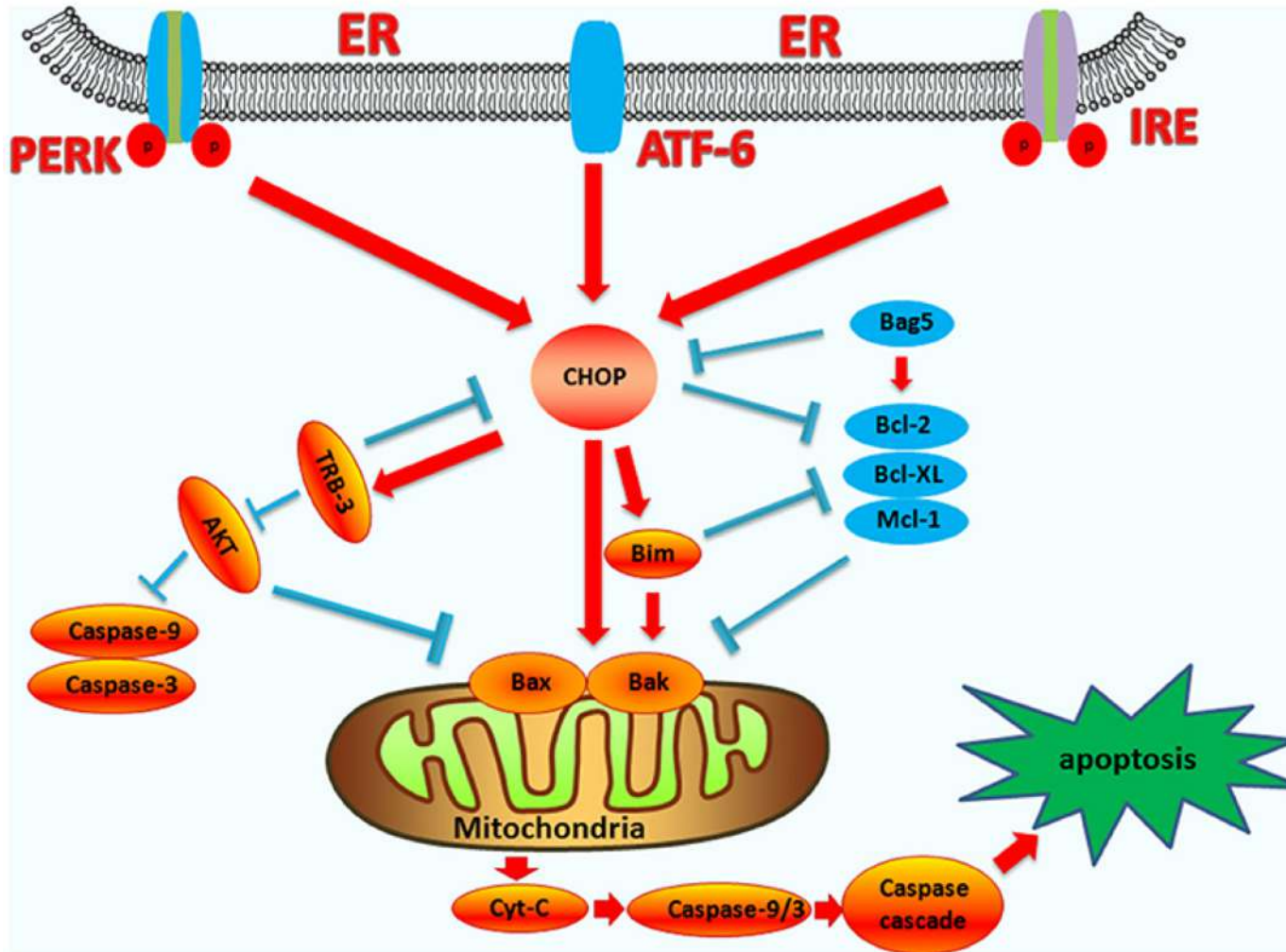
Pro-apoptosis



Bcl-2 e **Bak** sono sempre legati alla membrana mitocondriale; gli altri membri passano dal citosol (forme inattive) alla membrana mitocondriale (forme attive).

Le proteine “**BH3 only**” (le sentinelle) si attivano per proteolisi, defosforilazione ed altri meccanismi.

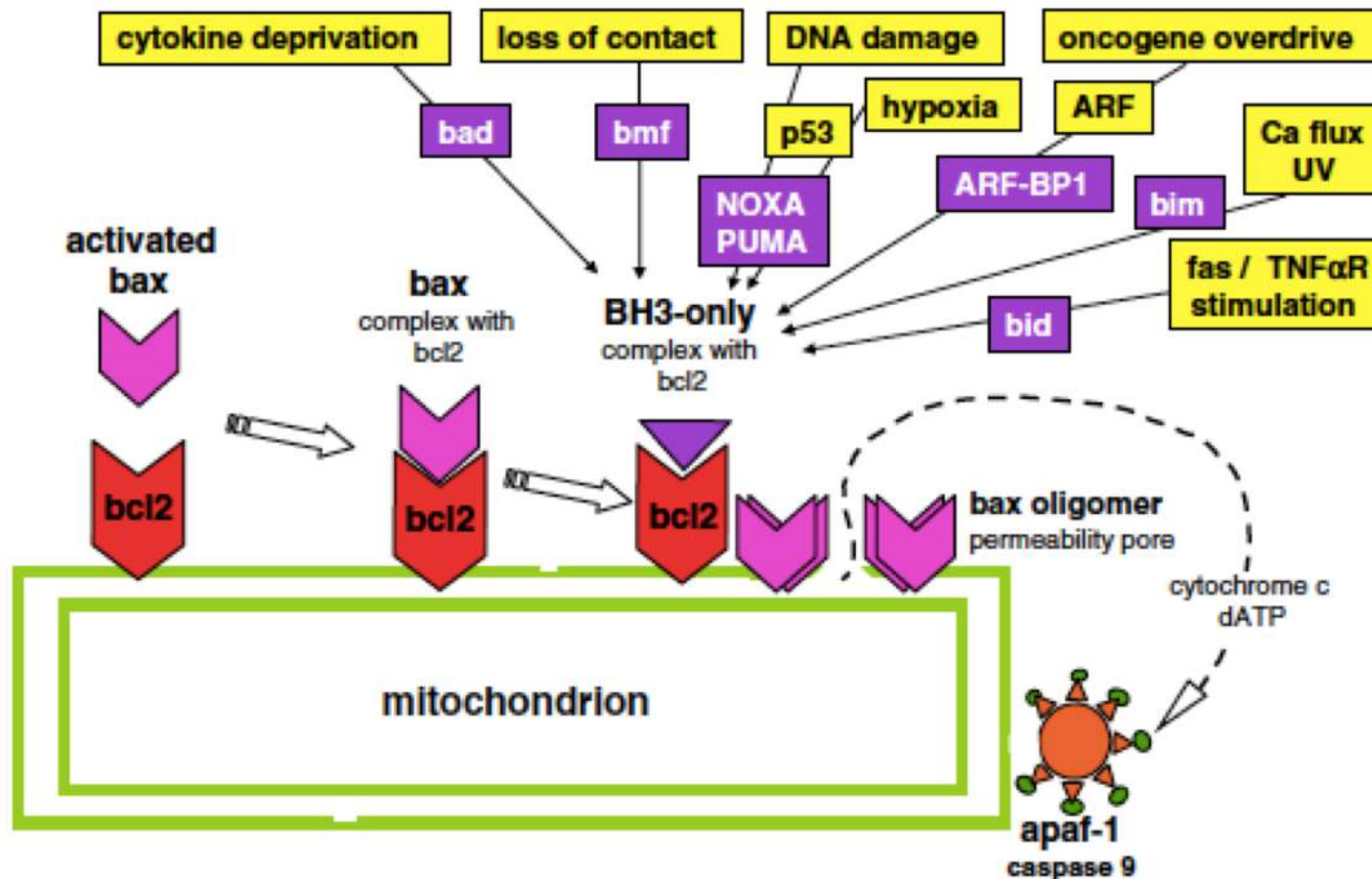
Il processo apoptotico da stress del reticolo (UPR) è mediato dalla proteina CHOP



CHOP innesca la via apoptotica intrinseca attraverso l'inibizione di BCL-2, BCL-XL, MCL-1 (fattori anti-apoptotici) e la up-regolazione di BIM (fattore pro-apoptotico), che regola la permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale mediata da BAX-BAK.

CHOP = C/EBP homologous protein attiva programmi trascrizionali pro-apoptotici

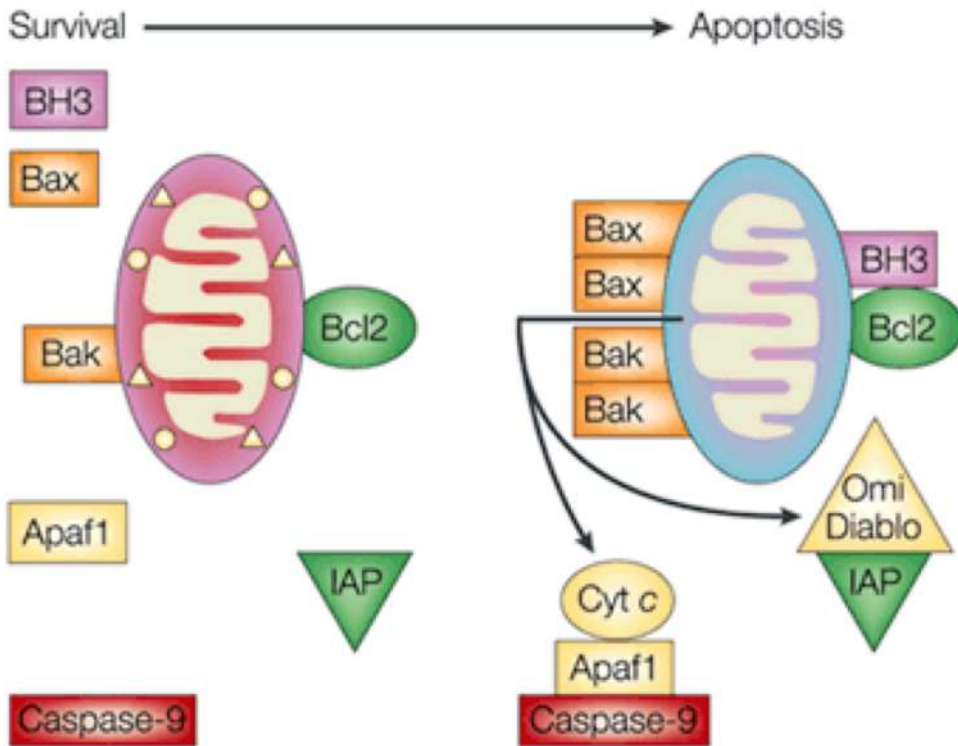
Interazione tra membri della famiglia BCL2



Rappresentazione schematica dell'interazione dei membri "BH3 only" della famiglia BCL2 con i complessi bax / bak-BCL2 / BCL_{XL} sulle membrane mitocondriali, in relazione a una varietà di stimoli.

L'integrità mitocondriale è controllata dai membri della famiglia Bcl-2

b Mammals: mitochondrial integrity model



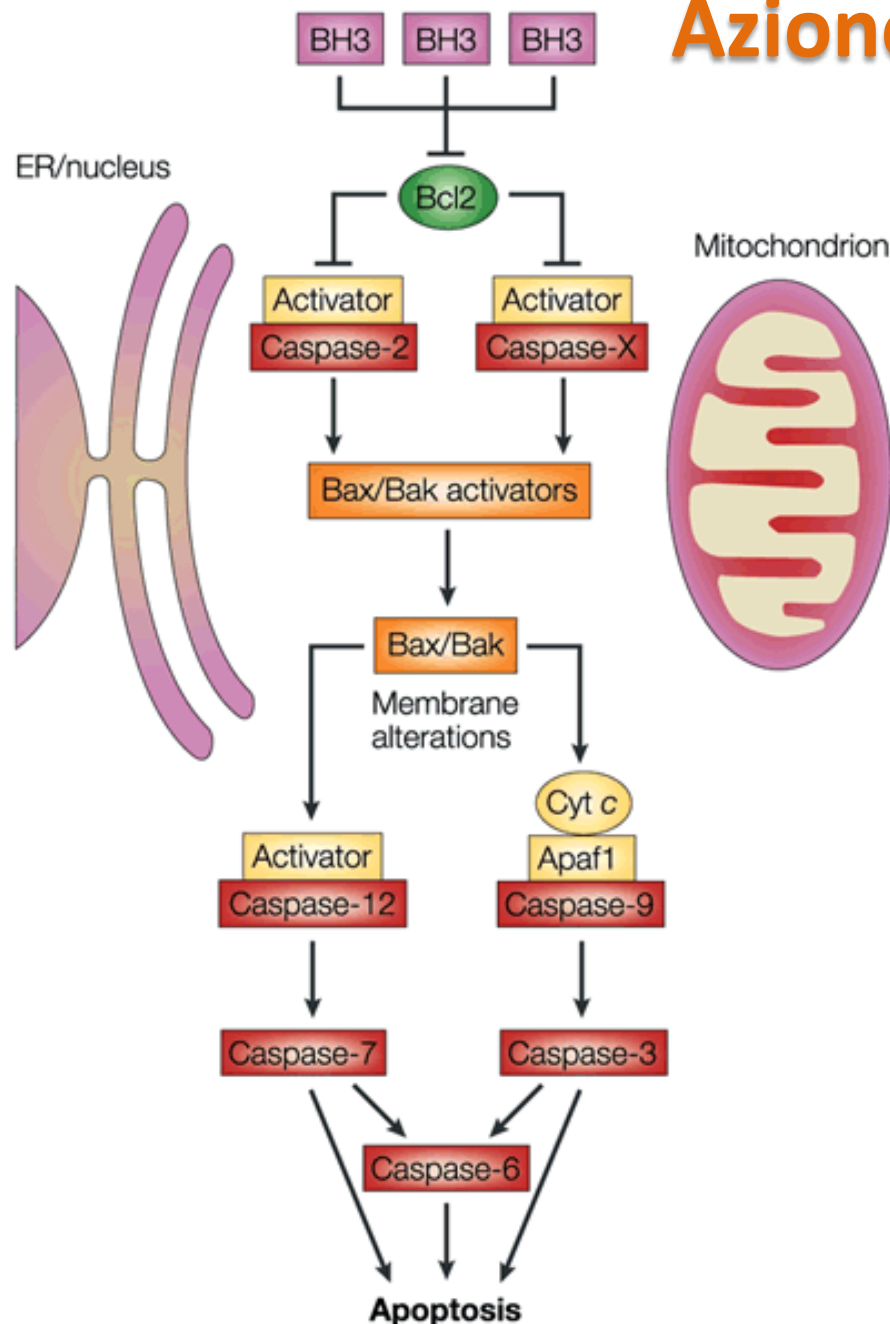
Membri pro-apoptotici:

Bax e Bak (effettori/esecutori)

**Bid, Bim, Puma Bad, BIK, BMF,
Noxa (le sentinelle)**

Protezione dell'integrità. Bcl2 e i suoi omologhi anti-apoptotici proteggono l'integrità della membrana mitocondriale fino a quando non vengono neutralizzati da una proteina BH3 only. Bax e Bak formano quindi omo-oligomeri all'interno della membrana mitocondriale, provocando il rilascio del citocromo c, che attiva Apaf1, permettendogli di legarsi e attivare la caspasi-9. Altre molecole pro-apoptotiche che escono dai mitocondri includono Omi e Diablo, che antagonizzano l'inibitore delle proteine dell'apoptosi (IAP). I complessi proteici sono mostrati come riquadri o triangoli giustapposti. Apaf1, fattore 1 di attivazione della apoptosi; cyt c, citocromo c.

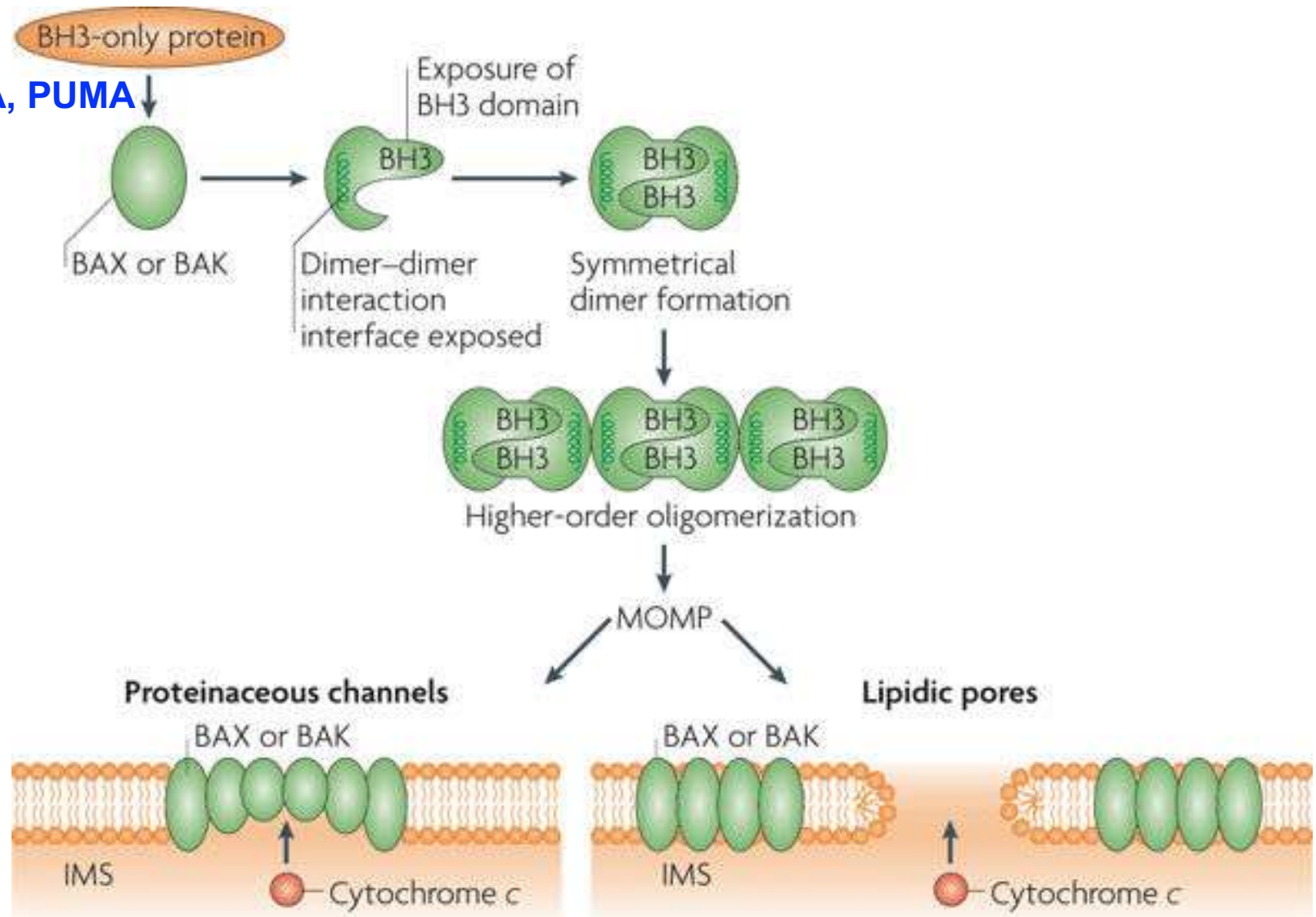
Azione delle proteine “BH3 only”



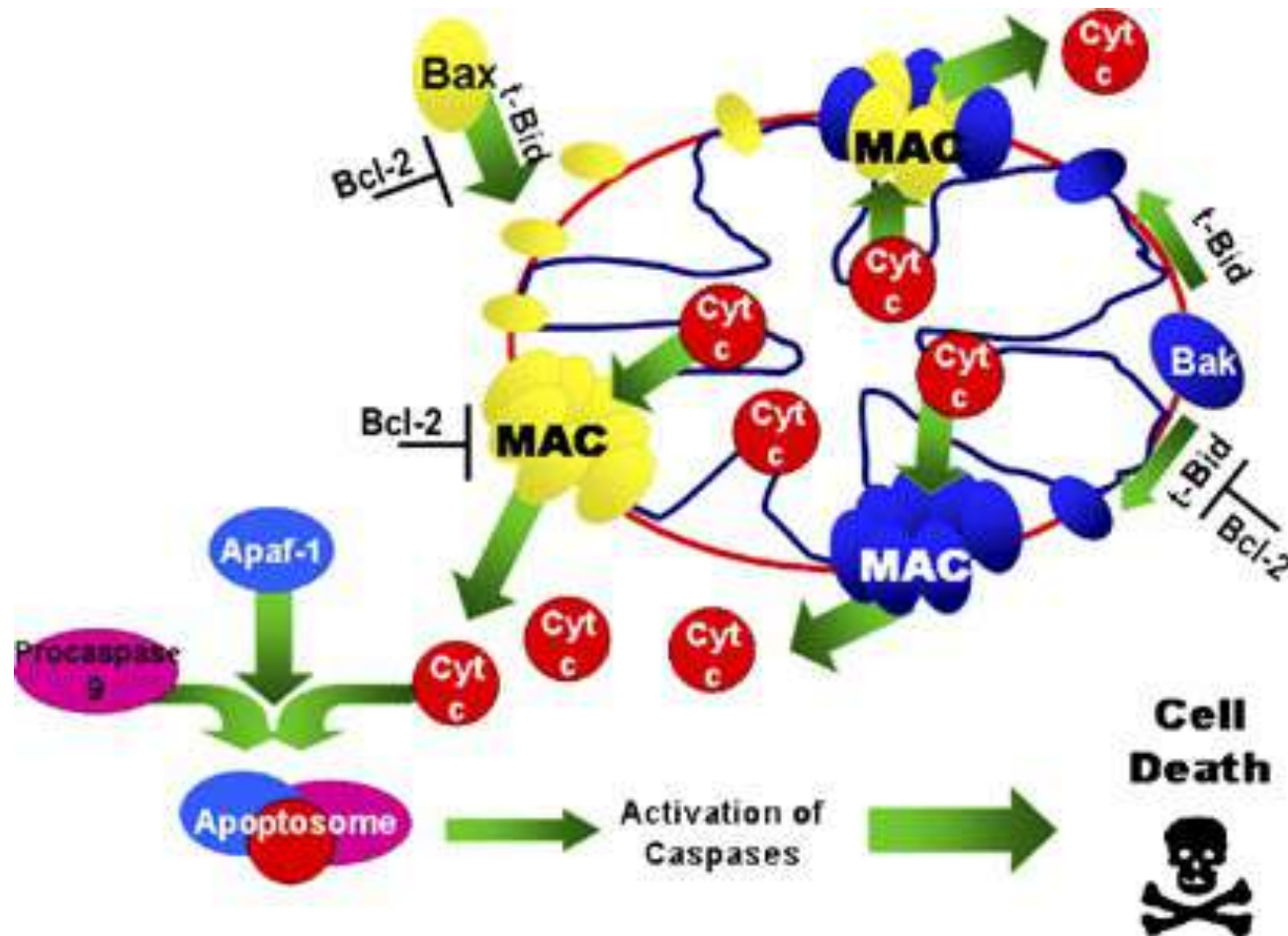
- Le proteine “BH3 only”: Bim, Bid, NOXA, PUMA sono i sensori degli stimoli apoptotici.
- I membri anti-apoptotici si legano a Bax e Bak pro-apoptotici bloccandone l'attività.
- Le proteine BH3 quando “attivate” si legano ai membri anti-apoptotici (Bcl-2, BclxL, Mcl1) ne bloccano l'azione e permettono di rilasciare Bax e Bak.
- Bax e Bak oligomerizzano a livello della membrana mitocondriale (coadiuvati dalle proteine BH3), inducendo così la depolarizzazione, il rilascio del citocromo c e l'attivazione della caspasi 9 che poi attiva le caspasi effettrici (3, 6, 7)

Oligomerizzazione di BAX o BAK sulla membrana esterna del mitocondrio

BIM, BID, NOXA, PUMA



Rilascio di citocromo C dal mitocondrio



Bax e **Bak** oligomerizzano sulla membrana esterna del mitocondrio formando un poro/canale detto **MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel)** attraverso cui fuoriesce il cyt C ed altri fattori proapoptotici

La formazione del **MAC** è inibita da Bcl-2 e dalle altre proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2

p53 (oncosoppressore): il principale controllore della via intrinseca dell'apoptosi

- **p53** ha un ruolo centrale nel limitare la proliferazione cellulare inducendo blocco del ciclo cellulare o anche apoptosi
- induce la trascrizione di Puma, Noxa, Bik, Bax, Bak, FAS e TRAILR2
- inibisce la trascrizione di Bcl-2
- induce variazioni conformazionali di Bax ed altri membri proapoptotici della famiglia Bcl-2

