

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
“ШКОЛА №1612 ДРЕВО ЖИЗНИ”

**Исследование роли плохо изученных онкогенов и антионкогенов
в образовании опухолей методами биоинформатики**

Авторы: Гудилина Полина

Руководитель: Киселёв Георгий Георгиевич

Москва, 2019 г.

Оглавление

Аннотация.....	3.
1. Организация.....	4.
2. Команда проекта.....	4.
3. Введение.....	4.
4. Цели и задачи.....	5.
5. Изучение литературных источников.....	6.
6. Материалы и методы.....	7.
7. Результаты	
7.1 Выбор и анализ базы данных онкогенов	8.
7.2 Вторичный отбор генов для дальнейшего анализа.....	9.
7.3 СНІС2 (Cysteine-rich hydrophobic domain-containing protein 2).10.	
7.4 Поиск гомологов выбранного белка.....	11.
8. Выводы.....	12.
9. Список используемой литературы.....	13.
10. Приложения.....	14.

Аннотация

В настоящее время раковые опухоли находятся на втором месте среди причин смертности людей в мире, таким образом, борьба с онкологическими заболеваниями является злободневной и крайне важной задачей для медицины 21-го века. В геноме человека существуют гены, которые положительно или отрицательно влияют на вероятность возникновения раковых опухолей. Такие гены называются онкогенами и антионкогенами. К настоящему моменту накоплены сведения о более чем 1000 онкогенах и антионкогенах, однако для многих из них механизм их влияния на вероятность возникновения раковых опухолей непонятен.

Для того, чтобы попытаться восполнить пробелы в понимании работы некоторых онкогенов или антионкогенов была проанализирована база данных соматических мутаций в раковых опухолях COSMIC. Целью данного анализа был выбор таких онкогенов или антионкогенов, пробелы в понимании работы которых возможно восполнить доступными школьникам методами биоинформатики.

Итогом данного анализа стал выбор гена *CHIC2* для дальнейшего исследования. Известно, что данный ген играет важную роль в развитии лейкемии, однако, практически ничего неизвестно о том, каким образом он участвует в данном процессе. В первую очередь, неизвестна пространственная укладка белка-продукта данного гена. В результате поиска гомологов данного гена выяснилось, что продукт данного гена имеет родство с белками подсемейства Гольджинов А7. Было проведено тщательное исследование гомологии белков *CHIC2* и представителей подсемейства Гольджинов А7, в результате чего было выявлено общее структурное ядро этих белков, удалось сделать определённые предсказания относительно вторичной структуры этих белков.

1. Организация

ГБОУ СОШ №1621 “Древо жизни” – занятия в рамках проектной деятельности

2. Команда проекта

Гудилина Полина (10 класс) – главный исполнитель проекта

Георгий Георгиевич Киселёв (учитель биологии и химии) – куратор проекта

3. Введение

Как известно, в настоящее время онкологические заболевания являются вторыми по частоте среди причин смертности, после сердечно сосудистых заболеваний. Сейчас, когда человечество научилось бороться с бактериальными и даже многими вирусными инфекциями, онкологические заболевания по праву можно назвать чумой 21-го века. Не будет преувеличением утверждение, что задачи выяснения того, какие факторы положительно, а какие отрицательно влияют на развитие злокачественных новообразований, являются одними из самых важных в медицине сегодняшнего дня. Красноречивым свидетельством этого тезиса является тот факт, что Нобелевская премия в области физиологии и медицины в 2018 году была присуждена двум учёным, за исследования в области лечения онкологии.

Среди множества факторов, влияющих на развитие рака, значительное место занимают наследственные факторы. Существуют гены, которые повышают вероятность развития раковых заболеваний, такие гены называются онкогенами. В противоположность им существуют гены, которые понижают риск возникновения раковой опухоли, такие гены называются антионкогенами. На данный момент науке известен огромный перечень онкогенов и антионкогенов. Информация по всем этим генам собрана и систематизирована

в обширных базах данных, содержащих тысячи учётных записей. Однако не для всех этих генов имеются сведения относительно того, каким образом те или иные гены влияют на вероятность развития рака.

В каких же местах могут образовываться пробелы в понимании работы тех или иных онкогенов или антионкогенов? Стоит напомнить, что ген это в первую очередь последовательность ДНК, кодирующая тот или иной белок организма. Соответственно, зачастую, бывает неизвестна именно функция белка – продукта гена; каким образом тот или иной белок влияет на вероятность появления раковой опухоли. Может быть неизвестна пространственная укладка данного белка, могут быть неизвестны его партнёры, с которыми он взаимодействует в клетке. Некоторые из этих аспектов в понимании работы конкретных генов возможно исследовать, не имея доступ к молекулярно-биологической или биохимической лаборатории. В условиях школьного проекта, даже обычный ученик может внести свой вклад в общественно значимое дело изучения причин возникновения рака, располагая некоторыми доступными ему методами биоинформатики, и, имея на руках лишь персональный компьютер с доступом в интернет.

4. Цели и задачи проекта

Целью данного проекта является глубокий анализ существующих баз данных онкогенов и антионкогенов человека, выбор из этих баз данных генов, механизмы влияния которых на возникновение раковых опухолей не до конца ясны, и восстановление пробелов в понимании работы данных онкогенов доступными методами биоинформатики.

Для того, чтобы это осуществить необходимо:

- Изучить научную литературу, разобраться с понятиями онкоген и антионкоген. Выяснить, каким образом онкогены и антионкогены влияют на образование опухолей
- Просканировать базы данных онкогенов и антионкогенов, и

выбрать из них плохо аннотированные

- Подробно изучить все сведения по данному гену, опубликованные в базе данных и в литературных источниках
- Выявить неясные моменты в функционировании данного гена, которые можно восполнить методами биоинформатики
- Изучить и научиться пользоваться методами биоинформатики, необходимыми для решения поставленной задачи
- Попробовать восполнить пробелы в понимании функционирования данного гена известными нам методами

5. Изучение литературных источников

Прежде чем приступить к исследованию, необходимо было разобраться с основными понятиями. Выяснить точное значение терминов онкоген и антионкоген, а, так же, выяснить по литературным источникам, каковы основные механизмы влияния онкогенов и антионкогенов на вероятность возникновения раковых опухолей.

Онкогенами называют такие гены, продукты которых могут стимулировать образование злокачественных опухолей. Мутации, приводящие к активации онкогенов, увеличивают вероятность того, что клетка переродится в раковую клетку. Напротив, антионкогены (они же гены-супрессоры опухолей) предохраняют клетку от ракового перерождения. Таким образом, вероятность возникновения раковой опухоли повышается либо в случае нарушения работы антионкогенов, либо при появлении онкогенов (в результате мутации или повышения активности протоонкогенов) [1]. Протоонкогеном называют обычный ген, который потенциально способен стать онкогеном из-за мутаций или повышения экспрессии. Многие протоонкогены кодируют белки, которые регулируют клеточный рост и дифференцировку. Протоонкогены часто вовлечены в пути передачи сигнала и в регуляцию митоза, обычно через свои белковые продукты.

Протоонкоген может стать онкогеном путём относительно незначительной модификации [2], [3]. Существуют три основных пути активации протоонкогена [4]. Первый это мутация внутри протоонкогена, которая меняет структуру белка, повышает его активность или приводит к увеличению его экспрессии. Второй – повышение концентрации данного белка путём, мутации в каком-либо другом гене, повышающем его экспрессию, или же дупликации его гена, а также (как вариант) повышению устойчивости данного белка и, как следствие, его стабильности в клетке. И последний путь – транслокация гена, хромосомная перестройка, которая может привести к увеличению экспрессии гена, или появлению постоянно активного гибридного белка.

Обычно клетки при возникновении в них мутаций подвергаются апоптозу, но, при условии, работы в них активного онкогена, могут избегать апоптоза и пролиферировать. Стоит отметить, впрочем, что часто активности одного онкогена бывает недостаточно для злокачественного перерождения клетки. Часто для этого оказывается необходимы либо дополнительные факторы внешней среды, либо мутация в каком-либо ещё гене [5].

С 1970-х годов открыты десятки онкогенов у человека. Многие лекарственные препараты, обладающие противораковым эффектом, направлены на подавление активности онкогенов или белков, которые они кодируют.

6. Материалы и методы

Для первичного анализа была выбрана база данных онкогенов COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer, cancer.sanger.ac.uk), для поиска информации по интересующим белкам, а также для поиска последовательностей белков использовалась аннотированная база данных белков Uniprot (www.uniprot.org), для поиска известных пространственных структур белков была использована база данных PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb>). Поиск гомологов белков производился при помощи

онлайн-инструмента BlastP (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Для построения множественных белковых выравниваний использовалось приложение Clustal omega. Для предсказания участков вторичной структуры использовался открытый веб-сервис PredictProtein (open.predictprotein.org).

7. Результаты

7.1 Выбор и анализ базы данных онкогенов

На начальном этапе работы предстояло выбрать базу данных онкогенов и антионкогенов для первичного анализа. В качестве таковой была выбрана база данных COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer, *Каталог соматических мутаций при раке*). Выбор был сделан в пользу этой базы данных, так как она показалась наиболее обширной и наиболее полно аннотированной базой данных по мутациям в раковых клетках, из находящихся в свободном доступе. База данных COSMIC сформирована в результате накопления данных в рамках масштабного проекта “Раковый геном”, осуществляющегося на базе Института Сенгера (Кембридж, Великобритания), однако, так же, содержит данные из других источников (многочисленных работ публикующихся по всему миру). Всего база данных насчитывает, на данный момент, около 6 миллионов записей. Ограниченный раздел этой базы данных, называемый “Cancer Gene Census” (*Перепись раковых генов*) содержит 723 записи, в которых содержатся идентификаторы, названия и аннотации тех генов, причинно-следственная взаимосвязь которых с возникновением раковых опухолей была экспериментально подтверждена.

Было решено проанализировать все 723 записи в разделе “Cancer Gene Census”. Поиск был направлен на выявление, генов, значительно вовлечённых в образование раковых опухолей. Особое внимание уделялось тем генам, в аннотации к которым имелись белые пятна, например, была неизвестна структура белкового продукта, не были известны лиганды данного белка, или же имелись какие-либо другие пробелы в понимании механизма их работы,

который приводил в итоге к возникновению раковых опухолей.

В результате данного первичного анализа были отобраны 47 генов, которые показались достаточно интересными для дальнейшего изучения (см. Приложение 1)

7.2 Вторичный отбор генов для дальнейшего анализа

Полученный на первом этапе работы список из 47 генов, необходимо было значительно сузить до одного или нескольких генов, которые и станут в дальнейшем объектами полноценного исследования. Уже на данном этапе работы стало ясно, что основной вклад нашего проекта в понимание механизмов работы того или иного онкогена будет заключаться, скорее всего, в определении пространственной структуры белка-продукта исследуемого гена, или же в определении его возможных лигандов или партнёров в клетке. Таким образом, при вторичном анализе, как правило, исключались из рассмотрения белки, относящиеся к семействам белков с хорошо известной топологией. Так из рассмотрения были исключены все белки, содержащие гомеобоксные домены. Топология всех гомеобоксных доменов является очень однотипной. И даже если для какого-либо конкретного белка из этого семейства всё ещё не была получена пространственная структура методом рентген кристаллографии, выяснение данной структуры не принесло бы ничего нового для понимания работы данного белка. По той же причине из рассмотрения были исключены все белки, содержащие в себе иммуноглобулиновые домены. Так же, из рассмотрения были исключены все белки, для которых в клетке известны партнёры белковой природы.

В результате вторичного анализа был выбран один единственный ген (CHIC2), который является пока наилучшим кандидатом в качестве объекта для дальнейшего исследования.

7.3 CHIC2 (Cysteine-rich hydrophobic domain-containing protein 2)

Сокращение CHIC2 является акронимом от Cysteine-rich hydrophobic

domain-containing protein 2 (*Белок, содержащий богатый цистеином гидрофобный домен, 2*). Это небольшой белок, всего 165 аминокислотных остатка в длину. Согласно базе данных COSMIC, для него не известна пространственная структура, однако известно, что белок имеет важное значение в развитии лейкемии. Согласно информации в базе данных Uniprot, белок локализован в первую очередь в плазматической мембране клеток, а так же в мембране пузырьков Гольджи. Белок представлен во многих тканях человеческого организма за исключением лишь некоторых. Так же известно, что подобные белки помимо человека встречаются ещё и у многих позвоночных.

Данный белок является идеальным объектом для дальнейшего исследования так как механизм, того, каким образом мутации в гене данного белка приводят к развитию лейкемии на данный момент является совершенно неизвестным.

Дальнейший путь исследования данного белка в рамках данного проекта представляется следующим:

- Необходимо попробовать предсказать статистическими методами участки вторичной структуры;
- Попытаться найти возможных отдалённых гомологов данного белка (не принадлежащих к семейству цистеин-богатых доменов);
- В случае положительного результата, выяснить известна ли пространственная структура для гомологов данного белка;
- И если результат поиска окажется положительным, возможно будет попытаться восстановить третичную структуру исследуемого белка методами гомологичного моделирования. Понимание третичной структуры белка может пролить свет на его функции;
- Можно попробовать в базах данных по белок-белковым взаимодействиям найти возможных клеточных партнёров данного белка, что так же может пролить свет на его функцию.

7.4 Поиск, гомологов выбранного белка, построение множественного выравнивания и предсказание вторичной структуры

При помощи интернет сервиса BlastP был произведён первичный поиск гомологов белка CHIC2, среди широкого круга белковых баз данных.

Помимо уже известных и очевидных гомологов, многочисленных родственников белка CHIC2 из других позвоночных, было так же обнаружено, что белок CHIC2 проявляет высокую степень гомологии с белками подсемейства Гольджинов A7. Если для белков данного подсемейства известны пространственные структуры в базе данных PDB, появится шанс установить третичную структуру белка CHIC2 методом гомологичного моделирования.

Установление пространственной укладки белка CHIC2, методом гомологичного моделирования, будет следующим шагом на пути данного исследования.

Были отобраны несколько представителей белков CHIC2 и целый ряд представителей подсемейства Гольджинов A7 для построения множественного белкового выравнивания. Множественное белковое выравнивание было построено при помощи онлайн сервиса Clustal omega. На множественном выравнивании видно, что все исследуемые белки, в своей центральной части имеют ярко выраженное общее ядро, по-видимому, являющееся хорошо сохранившимся структурно-консервативным доменом.

Была предпринята попытка предсказать участки вторичной структуры в структурном ядре этих белков. Для этого была использован открытый веб-сервис PredictProtein. При помощи данного сервиса было обнаружено, что общее структурное ядро данных белков представляет собой 3 продолжительные альфа-спирали (Приложение. 3).

Исследования в этом направлении будут обязательно продолжены в дальнейшем, возможно они смогут окончательно пролить свет на роль белка CHIC2 в развитии лейкемии.

8. Выводы

- На данный момент в соответствующих базах накоплены данные о большом количестве онкогенов и антионкогенов человека
- Далеко не для всех онкогенов и антионкогенов известен механизм их действия
- Используя методы биоинформатики, можно попробовать заполнить пробелы в понимании работы некоторых генов, а также их белковых продуктов
- Проанализирована база данных онкогенов и антионкогенов COSMIC, из неё было отобрано 47 генов для дальнейшего анализа
- В результате вторичного анализа из полученного списка были исключены гены, кодирующие домены, принадлежащие семействам с хорошо известной топологией, так как имеющимися у нас в распоряжении методами мы вряд ли сможем привнести что-либо новое в понимание работы этих генов
- На финальном этапе поиска для дальнейшего изучения был выбран ген с названием CHIC2, так как он играет значимую роль в развитии лейкемии, но механизм его участия в этом процессе неизвестен
- Обнаружено подсемейство белков Гольджинов A7, которые проявляют высокий уровень гомологии по отношению к белкам CHIC2.
- Было построено множественное выравнивание белков CHIC2 и целого ряда представителей подсемейства Гольджинов A7 в результате было выявлено общее структурное ядро этих белков, и были сделаны определённые

предсказания о наличии у них общих консервативных участков вторичной структуры.

9. Список используемой литературы

1. Weinberg, R.A. (2014). *The Biology of Cancer*. *Garland Science*, 231
2. Todd, R., Wong, D.T. (1999). Oncogenes. *Anticancer Res.* 19 (6A): 4729—46
3. Chial, H. (2008). Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. *Nature Education.* 1 (1)
4. Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6 (4): 259—69.
5. Negrini, M., Ferracin, M., Sabbioni, S., Croce, C.M. (2007) MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *J Cell Sci.* 120 (11): 1833—40

10. Приложения

ABI1+A1:B	abl-interactor 1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=ABI1
ACKR3	atypical chemokine receptor 3	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=ACKR3
ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=ACSL3
ASXL1	additional sex combs like 1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=ASXL1
BCL11L		
CARS	cysteine-tRNA synthetase	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CARS
CBFA2T3	core-binding factor; runt domain; alpha subunit 2; translocated to; 3 (MTG-16)	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CBFA2T3
CCDC6	coiled-coil domain containing 6	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CCDC6
CHIC2	cysteine-rich hydrophobic domain 2	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CHIC2
CIITA	class II; major histocompatibility complex; transactivator	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CIITA
CEP89	centrosomal protein 89kDa	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CEP89
CLTCL1	clathrin; heavy polypeptide-like 1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CLTCL1
CNBD1	cyclic nucleotide binding domain containing 1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CNBD1
CNBP	CCHC-type zinc finger; nucleic acid binding protein	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CNBP
CREB3L1	cAMP responsive element binding protein 3-like 1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CREB3L1
CREB3L2	cAMP responsive element binding protein 3-like 2	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CREB3L2
CREBBP	CREB binding protein (CBP)	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CREBBP
CRTC3	CREB regulated transcription coactivator 3	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CRTC3
CUX1	cut-like homeobox 1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CUX1
FANCD2	Fanconi anemia; complementation group D2	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=FANCD2
FAT1	FAT atypical cadherin 1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=FAT1
FAT4	FAT atypical cadherin 4	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=FAT4
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=DDIT3
GNA11	guanine nucleotide binding protein (G protein); alpha 11 (Gq class)	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=GNA11
GNAQ	guanine nucleotide binding protein (G protein); q polypeptide	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=GNAQ
ERC1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=ERC1
HOXA11	homeo box A11	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=HOXA11
EXT1	multiple exostoses type 1 gene	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=EXT1
EXT2	multiple exostoses type 2 gene	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=EXT2
KLF4	Kruppel-like factor 4	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=KLF4
LZTR1	leucine-zipper-like transcription regulator 1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=LZTR1
FOXA1	forkhead box A1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=FOXA1
LRP1B	LDL receptor related protein 1B	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=LRP1B
FOXL2	forkhead box L2	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=FOXL2
MED12	mediator complex subunit 12	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=MED12
NAB2	NGFI-A binding protein 2	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=NAB2
NDRG1	N-myc downstream regulated 1	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=NDRG1
PREX2	phosphatidylinositol-3; 4; 5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 2	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=PREX2
PAX7	paired box gene 7	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=PAX7
PDCD1LG2	programmed cell death 1 ligand 2	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=PDCD1LG2
PHOH	ras homolog family member H	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=PHOH
RNF213	ring finger protein 213	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=RNF213
PER1	period homolog 1 (Drosophila)	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=PER1
PXOX2B	paired-like homeobox 2b	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=PXOX2B
SLC34A2	solute carrier family 34 (sodium phosphate); member 2	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=SLC34A2
TFE3	transcription factor binding to IGDM enhancer 3	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=TFE3

Приложение. 1. Таблица, содержащая в себе идентификаторы и названия 47 генов, отобранных при первичном анализе базы данных COSMIC. Правый столбец содержит ссылки на учётные записи соответствующих генов в базе данных COSMIC.

COSMIC gene CHIC2 (COSG5954)

Genomic coordinates 4:54016999..54064300 (negative strand)

Synonyms CCDS3493.1, Q9UKJ5, ENSG00000109220

Recommended name:
Cysteine-rich hydrophobic domain-containing protein 2

Alternative name(s):

- BrX-like translocated in leukemia

Name: CHIC2

Играет роль в развитии лейкемии

UniProt annotation GO - Cellular component

Plasma membrane ← Присутствует в плазматической мембране клетки

Cell membrane ⓘ 1 Publication

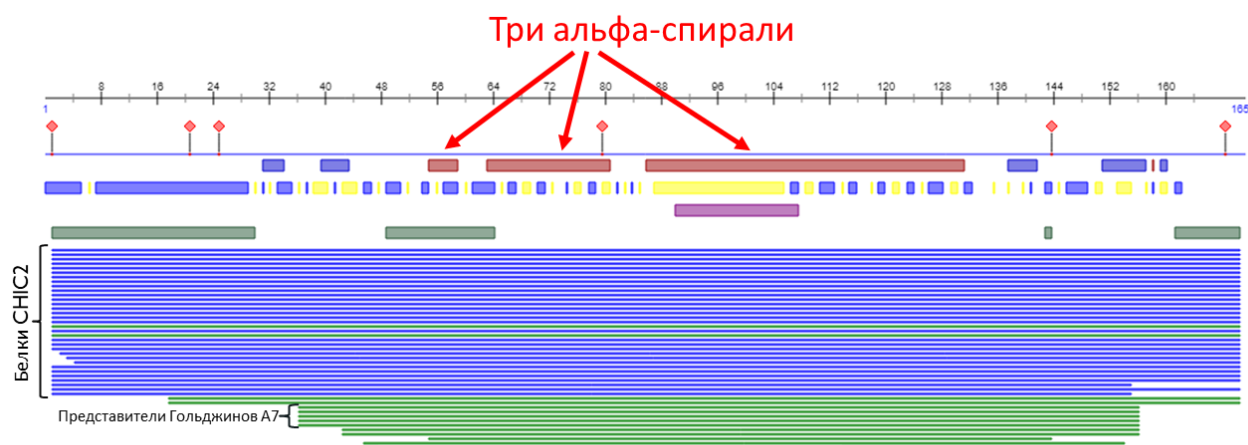
Other locations

Cytoplasmic vesicle ⓘ 1 Publication

Note: Also present at a Golgi-like vesicular compartment and at scattered vesicles.

← Присутствует в мембране пузырьков Гольджи

Приложение. 2. Скриншоты учётных записей белка CHIC2 в базах данных COSMIC и Uniprot, содержащие ключевые сведения об этом белке.



Приложение. 3. Диаграмма отображающая результаты анализа последовательностей белков CHIC2 и их предполагаемых гомологов при помощи вэб-сервиса PredictProtein. В верхней строчке диаграммы красным цветом отмечены три предполагаемых альфа-спиральных участка, общих для этих белков.