

УДК 575.113.12:579.873.71:004.9

## НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОВ МЕТИОНИНОВЫХ тРНК *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ *IN SILICO*

Л.В. ПОЛИЩУК

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины  
Украина, МСП Д03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 154  
e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

**Целью** данной работы была идентификация нуклеотидных последовательностей метиониновых тРНК штамма *S. globisporus* 1912-2. **Методы.** Ресурсы сервера NCBI (программы BLAST: blastx, discontinuous megablast и базы данных «Genome» и «Nucleotide») были использованы для анализа *in silico* библиотеки контигов *S. globisporus* 1912-2. **Результаты.** Определены *in silico* нуклеотидные последовательности 4 генов транспортных метиониновых РНК *S. globisporus* 1912-2. Установлено, что ген тРНК<sup>Мет</sup> (контиг № 21 (936–1008 п.н.)) и гены тРНК<sup>Мет</sup> (контиги № 299 (1713–1787 п.н.) и № 255 (5941–6015 п.н.)) кодируют молекулы тРНК II типа. **Выводы.** С использованием анализа *in silico* показано наличие 4 генов транспортных метиониновых РНК в геноме *S. globisporus* 1912-2, два из которых кодируют тРНК<sup>Мет</sup>. Определены нуклеотидные последовательности всех 4 генов тРНК<sup>Мет</sup>.

**Ключевые слова:** ген, тРНК, метионин, нуклеотидная последовательность, *Streptomyces*.

**В**ведение. Установлено, что у прокариот существуют два вида тРНК, специфичных к метионину – тРНК<sup>Мет</sup> и тРНК<sup>фМет</sup>. Обе эти тРНК могут присоединять метионин в реакции активации, но приобретать формильную группу и становиться иницирующей аминокислотой метионин может только в комплексе с последней (фМет-тРНК<sup>фМет</sup>). Другая же тРНК<sup>Мет</sup> принимает участие в элонгации полипептидной цепи. Доказано, что у прокариот N-концевым аминокислотным остатком всегда является остаток N-формилметионина. Именно наличие N-формильного остатка в комплексе фМет-тРНК<sup>фМет</sup> препятствует включению такой аминокислоты в состав пептида [1].

Как для тРНК<sup>Мет</sup>, так и тРНК<sup>фМет</sup> существует один соответствующий кодон иРНК – АУГ. Внутренние АУГ-триплеты иРНК специфичны по отношению к комплексу Мет-тРНК<sup>Мет</sup> и не связываются с фМет-тРНК<sup>фМет</sup> [2]. В настоящее время определены нуклеотидные последовательности многих тРНК<sup>Мет</sup> и тРНК<sup>фМет</sup> прокариот, в том числе и стрептомицетов (например, *S. rimosus*, *S. griseus*) [2, 3]. Установлен ряд отличий в строении молекул тРНК<sup>Мет</sup> и тРНК<sup>фМет</sup>, которые и определяют способность метионина только в составе комплекса Мет-тРНК<sup>фМет</sup> приобретать формильную группу и становиться иницирующей аминокислотой [1–6].

Целью работы было определение количества генов тРНК<sup>Мет</sup> в хромосоме *Streptomyces globisporus* 1912-2, их нуклеотидных последовательностей и локализации на контигах из библиотеки контигов тотальной ДНК штамма.

Определение нуклеотидных последовательностей тРНК<sup>Мет</sup> генов штамма *Streptomyces globisporus* 1912-2 имеет практическое и теоретическое значение. Например, знание о нуклеотидных последовательностях тРНК<sup>Мет</sup> и их количестве в геноме штамма, с одной стороны, позволит определить гомологию тРНК<sup>Мет</sup> генов *S. globisporus* 1912-2 и аналогичных генов других организмов, а, с другой – это начальный этап определения нуклеотидной последовательности всей хромосомы штамма и построения его генетической карты. Практическое значение информации о строении, локализации и количестве генов тРНК<sup>фМет</sup> в хромосоме

© Л.В. ПОЛИЩУК, 2016

связано с тем, что комплекс фМет-тРНК<sup>фМет</sup> является стимулятором биосинтеза белка клеткой микроорганизма и влияет на ее метаболизм и онтогенез [2, 5, 7].

### Материалы и методы

После определения нуклеотидной последовательности тотальной ДНК штамма *S. globisporus* 1912-2 была создана библиотека контигов, состоящая из 1438 фрагментов тотальной ДНК. Исследование нуклеотидной последовательности ДНК штамма *S. globisporus* 1912-2 было проведено аккредитованной компанией «BaseClear» (Лейден, Голландия) в 2013 г. Контиги имеют молекулярные размеры от 358 п.н. (контиг № 1421) до 75588 п.н. (контиг № 2). Суммарный молекулярный размер всех контигов библиотеки составляет 7,125 млн п.н.

Локализацию тРНК<sup>Мет</sup> генов на контигах проводили методом попарного выравнивания с помощью программы «bl2seq: megablast» из пакета BLASTN 2.2.31+ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) с использованием для первоначального поиска в качестве референсных нуклеотидные последовательности шести генов тРНК<sup>Мет</sup> *S. griseus* NBRC13350 (Идентифицированный номер AP009493, GenBank). Для выявления локализации иницирующих метиониновых тРНК штамма *S. globisporus* 1912-2 использовали информацию о нуклеотидной последовательности тРНК<sup>фМет</sup> *S. griseus* (X04543) [3].

При проведении анализа *in silico* использовали информацию баз данных сервера NCBI «Genome» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES>) и «Nucleotide» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). В работе были использованы нуклеотидные последовательности геномов 20 представителей семейства *Streptomycetaceae* штаммов *S. collinus* Tu 365 (CP006259), *S. rapamycinicus* NRRL 54491 (CP006567), *S. fuvissimus* DSM 40593 (CP005080), *Streptomyces sp.* PAMC26508 (CP003990), *S. albus* J1074 (CP004370), *S. hygroscopicus* TL01 (CP003720), *S. hygroscopicus* KCTC1717 (CP013219), *S. davawensis* JCM 4913 (HE971709), *S. hygroscopicus* 5008 (CP003275), *Streptomyces sp.* SirexAA-E (CP002993), *S. violaceusniger* Tu 4113 (CP002994), *S. cattleya* NRRL 8057 (FQ859185), *S. venezuelae* ATCC 10712 (FR845719), *S. flavogriseus* ATCC 33331 (CP002475), *S. bingchengensis* BCW-1 (CP002047), *S. scabiei* 87.22 (FN554889), *S. griseus* NBRC 13350 (AP009493),

*S. avermitilis* MA-4680 (BA000030), *S. globisporus* C-1027 (CP013738) и *Kitasatospora setae* KM\_6054 8.78 (NC\_016109).

### Результаты и обсуждение

Как известно, одним из свойств стандартного генетического кода является его вырожденность, или избыточность – одной и той же аминокислоте может соответствовать несколько кодонов иРНК [1]. Есть целый ряд аминокислот, которые кодируются двумя, четырьмя или даже шестью триплетами. Однако только один триплет иРНК (АУГ) кодирует аминокислоту метионин и одновременно является сайтом инициации трансляции: первый кодон АУГ в кодирующей области иРНК служит, как правило, началом синтеза белка [1 – 6].

При проведении анализа *in silico* библиотеки контигов ДНК штамма *S. globisporus* 1912-2 с использованием в качестве референсных нуклеотидных последовательностей шести генов тРНК<sup>Мет</sup> штамма *S. griseus* NBRC13350 были выявлены 4 фрагмента, идентичных им. Последовательности вероятных генов тРНК<sup>Мет</sup> штамма *S. globisporus* 1912-2 были обнаружены в на контигах №21 (936–1008 п.н.), №255 (5941–6015 п.н.), № 299 (1713–1786 п.н.) и №1166 (1–74 п.н.) (рисунок).

При исследовании полногеномных последовательностей 20 представителей семейства *Streptomycetaceae*, представленных в базе данных «Genome» было установлено наличие в каждой из них нескольких (от 4 до 7) генов, кодирующих метиониновые тРНК (таблица).

Так, в хромосоме штамма *S. venezuelae* ATCC 10712 (FR845719) обнаружены 4 гена, а в хромосомах *S. scabiei* 87.22 (FN554889), *S. hygroscopicus* TL01 (CP003720) и *S. hygroscopicus* 5008 (CP003275) – по 7 генов. В то же время большинство из проанализированных геномов, содержали 5 или 6 генов (соответственно 11 и 4 штамма). Например, хромосомы штаммов *S. globisporus* C-1027 (CP013738) и *S. flavogriseus* ATCC 33331 (CP002475) содержат по 5 генов, а в геноме штамма *S. griseus* NBRC 13350 (AP009493) присутствуют 6 генов.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей всех обнаруженных генов тРНК<sup>Мет</sup> показал, что их можно распределить на 3 группы. Из которых группа № 1 была самой многочисленной: идентичными были по 2 – 5 генов в геноме од-

SGR_tRNA12 <sup>1</sup>	tagcggggacaggattgaaactgcgacctctgggtatgagcccagcgagctaccgagctgctccaccgccg
Контиг 255 <sup>2</sup>	tagcggggacaggattgaaactgcgacctctgggtatgagcccagcgagctaccgagctgctccaccgccg
Контиг 299 <sup>2</sup>	tagcggggacaggattgaaactgcgacctctgggtatgagcccagcgagctaccgagctgctccaccgccg
SGR_tRNA15 <sup>1</sup>	tagcggtagccggactgaaccggtagacacagcgattatgagccgcttctctaccgactgagctacaccgct
Контиг 21 <sup>2</sup>	tagcggtagccggactgaaccggtagacacagcgattatgagccgcttctctaccgactgagctacaccgct
SGR_tRNA56 <sup>1</sup>	ggggcggtagctcagccggttagacagcggactcataatccgtcggccgtgggttcgagtcaccaccgcccaaccg
Контиг 1166 <sup>2</sup>	ggggcggtagctcagccggttagacagcggactcataatccgtcggccgtgggttcgagtcaccaccgccca

**Рисунок.** Нуклеотидные последовательности генов тРНК<sup>Met</sup> штаммов *S. griseus* NBRC13350 (1) и *S. globisporus* 1912-2 (2). Фрагмент последовательности референсного гена SGR\_tRNA56, отсутствующий в последовательности контига 1166 *S. globisporus* 1912-2, выделен подчеркиванием

**Таблица.** Группы генов метиониновых тРНК стрептомицетов с гомологичными нуклеотидными последовательностями

Штаммы	Номер*, GenBank	Группы идентичных генов тРНК <sup>Met</sup>		
		группа 1	группа 2	группа 3
<i>S. hygroscopic.</i> TLO1	CP003720	SHJGH_t31 SHJGH_t54 SHJGH_t55 SHJGH_t63 SHJGH_t68**	SHJGH_t52	SHJGH_t12
<i>S. hygroscopic.</i> 5008	CP003275	SHJG_t31 SHJG_t54 SHJG_t55 SHJG_t63 SHJG_t68**	SHJG_t52	SHJG_t12
<i>S. hygroscopic.</i> <i>KCTC1717</i>	CP013219	SHL15_R47 SHL15_R73 SHL15_R74 SHL15_R85	SHL15_R71	SHL15_R21
<i>S. bingchenggen.</i> BCW-1	CP002047	SB1_t18*** SB1_t19 SB1_t25	SB1_t46	SB1_t63
<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	FR845719	SVEN_t48*** SVEN_t57	SVEN_t54	SVEN_t12
<i>S. griseus</i> NBRC 13350	AP009493	SGR_tRNA12 SGR_tRNA13 SGR_tRNA18 SGR_tRNA37	SGR_tRNA15	SGR_tRNA56
<i>S. globisporus</i> C-1027	CP013738	WQO_21235 WQO_23910 WQO_23920	WQO_10060	WQO_16175
<i>S. cattleya</i> NRRL 8057	FQ859185	SCAT_tRNA20 SCAT_tRNA21 SCAT_tRNA50	SCAT_tRNA18	SCAT_tRNA62
<i>S. globisporus</i> 1912-2	—	Контиг № 299 (1713-1787 п.н.) Контиг № 255 (5941-6015 п.н.)	Контиг № 21 (936-1008 п.н.)	Контиг № 1166 (1-74 п.н.)

Примечание: \* – Идентификационный номер в базе данных GenBank, \*\* – 99,5 % идентичность нуклеотидных последовательностей генов исследуемых штаммов реперной последовательности X04543, \*\*\* – ген кодирует тРНК I типа.

ного штамма. Например, у штамма *S. hygroscopicus* TL01 в эту группу были отнесены 5 генов из 7, найденных в его геноме; в то время как у штамма *S. venezuelae* ATCC 10712 – 2 тРНК<sup>Met</sup> гена. В две остальные группы входили по одному гену у каждого из 20 штаммов. Нуклеотидные последовательности генов в каждой из 3 групп были идентичными генам *S. griseus* NBRC 13350, как правило, на 100 % (таблица). У 3 штаммов из группы №1 в геномах были выявлены последовательности идентичные на 94,5 – 99,5 % 4 референсным *S. griseus*.

В настоящее время определены нуклеотидные последовательности ряда иницирующих тРНК<sup>Met</sup> прокариот, в том числе и стрептомицетов (например, *S. rimosus* – M32255 и M32254, *S. griseus* – X04543) [3, 4]. *In silico* анализом, с использованием в качестве референсной нуклеотидной последовательности гена тРНК<sup>Met</sup> *S. griseus*, было установлено, что члены группы №1 тРНК<sup>Met</sup> генов являются иницирующими метиониновыми тРНК.

Поиск *in silico* последовательностей вероятных генов тРНК<sup>Met</sup> *S. globisporus* 1912-2 обнаружил 2 последовательности, локализованные на контигах № 255 и №299 (таблица). Нуклеотидные последовательности обоих вероятных генов тРНК<sup>Met</sup> *S. globisporus* 1912-2 полностью совпадают с последовательностью аналогичных генов *S. griseus* NBRC 13350.

Наличие в геномах штаммов стрептомицетов нескольких генов, кодирующих иницирующие тРНК<sup>Met</sup>, объясняется важной ролью их продуктов в метаболизме и цитодифференциации, что необходимо для выживания организма [7]. В геномах других микроорганизмов так же обнаружено наличие более одного гена иницирующих тРНК<sup>Met</sup>. Например, геном *Escherichia coli* содержит 4 гена тРНК<sup>Met</sup> [7].

Необходимо отметить, что размер иницирующей метиониновой тРНК штамма *S. griseus* (X04543) составляет 77 н. [3]. Установлено, что гены, кодирующие тРНК<sup>Met</sup> стрептомицетов (в том числе и 4 гена *S. griseus* NBRC 13350), имеют размер 74 п.н., так как у них отсутствуют 3 нуклеотида аминокцепторных ССА-концов. Таким образом, они принадлежат к тРНК II типа [8, 9]. Фрагменты контигов *S. globisporus* 1912-2 № 255 и №299, содержащие вероятные гены тРНК<sup>Met</sup>, так же имеют размер 74 п.н. (таблица). В то же время, у штам-

мов *S. rapamycinicus* NRRL 5491 (CP006567.1), *S. albus* J1074 (CP004370.1), *S. cattleya* DSM 46488 (CP003219.1) и еще ряда культур (всего у 7 штаммов из 20) обнаружено по одному гену тРНК<sup>Met</sup>, кодирующему тРНК I типа, тогда как остальные 2–3 гена кодируют тРНК II типа.

Анализ *in silico* нуклеотидных последовательностей генов тРНК<sup>Met</sup> 20 представителей семейства *Streptomycetaceae*, гомологичных SGR\_tRNA56 (77 п.н.) и SGR\_tRNA15 (73 п.н.) *S. griseus* NBRC 13350 выявил, что все гены культур имеют соответствующие молекулярные размеры и их нуклеотидные последовательности идентичны на 100 % последовательностям вышеуказанных генов реперного штамма. Транспортные метиониновые РНК, кодируемые генами из группы № 2, так же являются тРНК II типа.

Показано, что идентифицированные *in silico* нуклеотидные последовательности тРНК<sup>Met</sup> генов *S. globisporus* 1912-2 из групп № 2 и № 3 идентичны по нуклеотидной последовательности на 100 % генам SGR\_tRNA15 и SGR\_tRNA56 *S. griseus* NBRC 13350 (рисунок, таблица). тРНК<sup>Met</sup>, кодируемая геном, локализованным на контиге № 21 является тРНК II типа.

Однако нуклеотидная последовательность тРНК<sup>Met</sup> гена *S. globisporus* 1912-2, локализованного на контиге № 1166 (группа № 3), короче референсной (SGR\_tRNA56) на 3 пары нуклеотидов. На рисунке этот фрагмент 3'-конца гена SGR\_tRNA56 выделен подчеркиванием. Необходимо отметить, что первая пара нуклеотидов последовательности контига №1166 *S. globisporus* 1912-2 (и, соответственно, тРНК<sup>Met</sup> гена) идентична 4 п.н. последовательности использованного реперного гена *S. griseus* NBRC 13350.

Размер генома *S. globisporus* C-1027 составляет 7,69 млн п.н. и он содержит 5 генов тРНК<sup>Met</sup>, а суммарный размер всех контигов *S. globisporus* 1912-2 составляет 7,125 млн п.н. и можно было бы предположить, что в геноме последнего должны присутствовать только 4 тРНК<sup>Met</sup> гена.

Однако показано, как для стрептомицетов разных видов (на примере 18 культур), так и для разных штаммов одного и того же вида (в нашем случае *S. hygroscopicus*) количество генов тРНК<sup>Met</sup> не коррелирует с размерами их генома.

В геномах штаммов *S. rapamycinicus* NRRL 54491 (12,70 млн п.н.), *S. violaceusniger* Tu 4113 (10,65 млн п.н.), *S. bingchengensis* BCW-1 (11,93 млн п.н.) и *S. cattleya* NRRL 8057 (6,28 млн п.н.) идентифицировано по 5 генов тРНК<sup>Met</sup>. Тем не менее, размер генома штамма *S. cattleya* NRRL 8057 в 1,6–2 раза меньше, чем у первых трех. В то же время, хромосома штамма *S. albus* J1074 (6,84 млн п.н.) содержит 6 генов тРНК<sup>Met</sup>. Размеры хромосомных ДНК штаммов *S. hygrosopicus* 5008, TL01 и KCTC1717 составляют, соответственно, 10,15 млн п.н., 9,84 млн п.н. и 10,53 млн п.н. В результате анализа *in silico* было обнаружено по 5 генов тРНК<sup>Met</sup> в геномах штаммов *S. hygrosopicus* 5008 и TL01, а в хромосоме штамма *S. hygrosopicus* KCTC1717 – 4 аналогичных гена (таблица).

Таким образом, нашими исследованиями показана необходимость проводить идентификацию генов тРНК<sup>Met</sup> в хромосоме каждого конкретного штамма микроорганизма для определения их количества в геноме именно этого организма; нуклеотидной последовательности каждого из выявленных генов; их функций и типов тРНК, которые они кодируют.

### Выводы

В результате проведенных исследований идентифицированы *in silico* 4 гена транспортных метиониновых РНК в геноме *S. globisporus* 1912-2. Два из них кодируют тРНК<sup>Met</sup>. Определены нуклеотидные последовательности всех 4 генов тРНК<sup>Met</sup>.

### Список литературы

1. Ленинджер А. Основы биохимии. Т. 3. – М.: Мир, 1985. – 367 с.
2. Gualerzi C.O., Pon C.L. Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects // Cell. Mol. Life. Sci. – 2015. – Vol. 72, No. 22. – P. 4341–4367.
3. Kuchino Y., Yamamoto I., Nishimura S. Nucleotide sequence of *Streptomyces griseus* initiator tRNA // Nucleic. Acids. Res. – 1982. – Vol. 10, No. 21. – P. 6671–6684.
4. Gamulin V., Sull D. The initiator tRNA genes from *Streptomyces rimosus* // Nucleic. Acids. Res. – 1987. – Vol. 15, No. 16. – P. 6747.
5. Nakamoto U. Evolution and the universality of the mechanism of initiation of protein synthesis // Gene. – 2009. – Vol. 432, No. 1–2. – P. 1–6.
6. Samhita L., Shetty S., Varshney U. Unconventional initiator tRNAs sustain *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2012. – Vol. 109, No. 32. – P. 13058–13063.
7. Samhita L., Nanjundiah V., Varshney U. How many initiator tRNA genes do *Escherichia coli* need? // J. Bacteriol. – 2014. – Vol. 196, No. 14. – P. 2607–2615.
8. Pohl M., Gamulin V. Five transfer RNA genes lacking CCA termini are clustered in the chromosome of *Streptomyces rimosus* // Mol. Gen. Genet. – 1990. – Vol. 222. – P. 129–134.

9. Newton D.T., Creuzenet C., Mangroo D. Formylation is not essential for initiation of protein synthesis in all eubacteria // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, No. 32. – P. 22143–22146.

Представлена И.О. Андреевым  
Поступила 03.03.2016

### НУКЛЕОТИДНІ ПОСЛІДОВНОСТІ ГЕНІВ МЕТИОНІНОВИХ ТРНК *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2, ЯКІ ВИЗНАЧЕНІ *IN SILICO*

Л.В. Полищук

Інститут мікробіології і вірусології НАН України  
Україна, МСП Д03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 154  
e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

**Метою** даної роботи було визначення нуклеотидних послідовностей транспортних метионинових РНК штаму *S. globisporus* 1912-2. **Методи.** Ресурси сервера NCBI (програми BLAST: blastx, discontinuous megablast та бази даних: «Genome» та «Nucleotide») використано для аналізу *in silico* бібліотеки контигів *S. globisporus* 1912-2. **Результати.** Визначено *in silico* нуклеотидні послідовності 4 генів транспортних метионинових РНК *S. globisporus* 1912-2. Встановлено, що тРНК<sup>Met</sup> ген (контиг № 21 (936–1008 п.н.) і тРНК<sup>Met</sup> гени (контиги № 299 (1713–1787 п.н.) та № 255 (5941–6015 п.н.)) кодують молекули тРНК II типу. **Висновки.** За використання аналізу *in silico* встановлено наявність 4 генів транспортних метионинових РНК в геномі *S. globisporus* 1912-2, два з яких кодують тРНК<sup>Met</sup>. Визначено нуклеотидні послідовності всіх 4 генів тРНК<sup>Met</sup>.

**Ключові слова:** ген, тРНК, метионін, нуклеотидна послідовність, *Streptomyces*.

### NUCLEOTIDE SEQUENCES OF tRNA-METHIONINE GENES OF *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2, IDENTIFIED *IN SILICO*

L.V. Polishchuk

Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine  
Ukraine, MSP D03680, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 154  
e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

**Aim** of this work was to identify nucleotide sequences of tRNA<sup>Met</sup> of *S. globisporus* 1912-2. **Methods.** Resources of server NCBI (programs BLAST: blast, discontinuous megablast and databases: «Genome», «Nucleotide») were used for *in silico* analysis of library of *S. globisporus* 1912-2 contigs. **Results.** Nucleotide sequences of 4 genes of tRNA<sup>Met</sup> of *S. globisporus* 1912-2 were determined *in silico*. Molecules of tRNA of the II type were translated from tRNA<sup>Met</sup> gene (Contig № 21 (936–1008 bp)) and the molecules of tRNA<sup>Met</sup> genes (Contigs № 299 (1713–1787 bp), № 255 (5941–6015 bp)). **Conclusions.** 4 genes of transfer RNAs-methionine were identified *in silico* in *S. globisporus* 1912-2 genome. Two genes from them coded tRNA<sup>Met</sup> molecules. The nucleotide sequences of all tRNA<sup>Met</sup> genes were identified.

**Keywords:** gene, tRNA, methionine, nucleotide sequence, *Streptomyces*.