

الأساس الكيماوي للمادة الوراثية

المادة الوراثية :

يعد الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA هو المادة الحاملة للمعلومات الوراثية في جميع الكائنات الحية باستثناء بعض الفيروسات التي تكون فيها جزيئات الحامض النووي الرايبوزي RNA هي المدة الحاملة للمعلومات الوراثية. ولم تكن هذه المعلومات معروفة سابقا حيث كان يعتقد أول الأمر إن البروتين هو المادة الحاملة والناقلة للمعلومات الوراثية إلا إن التقدم العلمي الذي أحرز آثار الشكوك حول هذا الاعتقاد.

فقد لوحظ أن جزيئات الـ DNA تكون ثابتة ومستقرة في خلايا الكائنات الحية على العكس من البروتينات التي تتغير دائما. كما لوحظ أن جميع خلايا الكائن الحي الواحد تحتوي على كميات متساوية من الـ DNA في حين أن مجاميع الخلايا المختلفة في الكائن الحي الواحد تحتوي على أنواع وكميات مختلفة من البروتينات، مما أدى إلى اتجاه الأنظار نحو الدنا (DNA) باعتبارها المادة التي تكون على الأغلب هي المسؤولة عن حمل المعلومات الوراثية.

قام الباحث كرفث Griffith عام 1928 م بأجراء تجربته الرائدة التي أثبت فيها قطعاً أن DNA هي المادة الحاملة للمعلومات الوراثية. وقد أجرى كرفث تجربته على البكتريا المسببة لمرض ذات الرئة وهي بكتريا *Diplococcus pneumonia*، إذ يوجد نمطان مختلفان من خلايا بكتريا *Diplococcus pneumonia* تكون خلايا النمط الأول محاطة بمحفظة تعطي المستعمرات النامية مظهراً ناعماً وتسمى الخلايا الناعمة (S) Smooth cell ويكون هذا النمط مرضياً أي يكون مسنولاً عن الإصابة بمرض ذات الرئة وذلك بسبب وجود المحفظة، أما خلايا النمط الثاني فيطلق عليها الخلايا الخشنة (R) Rough cell لأنها تكون مستعمرات خشنة المظهر بسبب فقدانها المحفظة وبهذا فهي غير مرضية (لا تسبب الإصابة بمرض ذات الرئة)، وقد لوحظ عند حقن الفئران بالخلايا الناعمة (S) يؤدي إلى موتها بعد فترة نتيجة تكاثر هذه الخلايا المرضية في جسمها، إلا أن قتل الخلايا الناعمة بالحرارة قبل الحقن سيفقدها التأثير على الفئران. كما لا تظهر الخلايا الخشنة الحية أي تأثير مؤذ على الفئران لأنها غير مرضية.

لاحظ كرفث أنه عند حقن عدد من الفئران بخليط مكون من عدد قليل من الخلايا *Diplococcus pneumonia* الخشنة الحية وعدد كبير من خلايا السلالة الناعمة (S) المقتولة بالحرارة لاحظ ظهور أعراض المرض الذي تسببه الخلايا الناعمة الحية على عدد من الفئران المحقونة، ومما أثار الدهشة أيضاً أنه قد تمكن من عزل أعداد كبيرة من الخلايا الناعمة (S) من نماذج الدم المأخوذة من الفئران المريضة مما يشير إلى أن الخلايا الناعمة الميتة قد حولت الخلايا الخشنة الحية إلى خلايا ناعمة مرضية خلال تواجدهما معا في الفأر. تركز البحث بعد هذه السلسلة من التجارب حول طبيعة المادة الموجودة في مستخلص الخلايا الناعمة المسؤولة عن عمليات التحول التي أطلق عليها آنذاك اسم مبدا التحول (Transformation principle).

وقد اكتشف فيما بعد وعلى أثر سلسلة من التجارب أن مبدا التحول هو الحامض النووي DNA، وكانت التجربة التي أجراها أفيري وماكلويد ومكارتني عام 1944 من أولى التجارب التي أثبتت ذلك حيث أضافوا جزيئات DNA محضرة بصورة نقية من الخلايا الناعمة (S) إلى خلايا خشنة (R) في انبوبة اختبار ونتاج هذه الاضافة الحصول على بعض الخلايا الناعمة من نوع (S)، مما يؤكد دور الـ DNA بصورة لا تقبل الشك بكونه هو المسؤول عن نقل الصفات الوراثية ومما يؤكد دور الـ DNA في عملية التحول هو انزيم (DNAase) الذي يعمل على تحطيم جزيئات الـ DNA، فقد وجد أن معاملة الدنا بهذا الانزيم قبل اضافتها للخلايا الخشنة ابطل نهائياً عملية التحول في حين أن معاملة الـ

DNA بانزيم التربسين (Trypsin) والذي يحطم البروتينات فقط لم يكن له أي تأثير على عملية التحول مما أدى الى استبعاد احتمالية وجود ملوثات بروتينية مع الدنا المحضرة يمكن ان تكون قد قامت بدورها في عملية التحول.

بناء وتركيب ال DNA

يتربك الحامض النووي الـ DNA من سلسلة طويلة من الوحدات البنائية التي تسمى النكليوتيدات، ويتكون كل نكليوتيد من سكر خماسي رايبوزي منقوص الاوكسجين مرتبط بمجموعة فوسفات وقاعدة نتروجينية، علما ان تسلسل القواعد النتروجينية في شريط الدنا هو الذي يحدد الطبيعة الوراثية المميزة لهذه الجزيئات . وتعود القواعد النتروجينية التي تدخل في تركيب الاحماض النووية الى مجموعتين رئيسيتين :

- 1- البيورينات: وتشمل الادنين (A) والكوانين (G).
 - 2- البايرومدينات : وتشمل السايوتوسين (C) والثايمين (T) وكذلك اليوراسيل (U) والذي يدخل في تركيب الحامض النووي RNA بدلا عن الثايمين.
- ترتبط البيورينات والبايرمدينات مع السكر الخماسي عن طريق اواصر كلايكوسيدية تتكون من ذرة كاربون رقم (1) للسكر الخماسي وذرة النتروجين رقم (1) للبيرومدينات وذرة النتروجين رقم (9) للبيورينات وتدعى الجزيئة الناتجة عن هذا الارتباط بالنكليوسايد. ولكي يمكن للنكليوسايد ان يكون جزءا من الـ DNA او الـ RNA فلا بد ان يرتبط اولا مع مجموعة الفوسفات ليكون الوحدة البنائية للاحماض النووية والتي تسمى النكليوتايد. ترتبط النكليوتيدات المكونة للحامض النووي عن طريق اواصر كيميائية تتكون من مجموعة الفوسفات المرتبطة مع ذرة الكربون رقم (5) للسكر الخماسي لاحد النكليوتيدات وبين ذرة الكاربون رقم (3) للسكر الخماسي للنكليوتيد التالي، وبهذا ستتكون سلسلة من الاواصر القوية التي تدعى بالاواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر تحمل النكليوتيدات مع بعضها على طول شريط الـ DNA او الـ RNA. يكون السكر الخماسي ومجموعة الفوسفات العمود الفقري لسلسلة نكليوتيدات الـ DNA في حين تبرز القواعد النتروجينية من هذا العمود الفقري، وبما انها جزيئات مسطحة فانها تكون مرتبة الواحدة فوق الاخرى.

البناء التركيبي للولب المزدوج (المادة الوراثية DNA):

اوضح كل من واطسن وكريك لأول مرة عام 1953م البنية الحلزونية المزدوجة للـ DNA حيث وجد هذان العالمان ان الـ DNA يتكون من سلسلتين متكاملتين تلتفان حول بعضهما ليكونا حلزونا مزدوجا منتظما، وتشكل فيه وحدات السكر الخماسي ومجموعة الفوسفات الجزء الخارجي للحلزون، في حين تبرز القواعد النتروجينية من العمود الفقري الى الداخل وبمستوى عمودي على محور الحلزون، وان كل سلسلة تحتوي على عشرة نكليوتيدات في كل لفة كاملة .

ترتبط سلسلتنا الحلزون مع بعضهما عن طريق الاواصر الهيدروجينية المتكونة بين ازواج القواعد النتروجينية، حيث يزدوج الادنين دائما مع الثايمين باصرتين هيدروجينيتين والكوانين مع السايوتوسين بثلاث اواصر هيدروجينية.

لقد وضع كل من واطسن وكريك عام 1953 البناء التركيبي للـ DNA حيث افترضوا ان هناك سلسلتين من البولي نيكليوتيدات لتشكل اللولب المزدوج او جزيئة مزدوجة وتطبق نماذج العصي والكرات البلاستيكية جربا فكرة وضع العمود الفقري المكون من السكر والفوسفات الى الخارج وجعل القواعد النتروجينية الى داخل اللولب، ولأجل الحصول

على تركيب لولبي مستقر يعطي الابعاد الصحيحة للجزيئة ويجب ان تكون القاعدة النتروجينية (A) مقابل القاعدة (T) وان تكون القاعدة (C) مقابل القاعدة (G) وهذا ما يطلق عليه بالازدواج القاعدي Base – pair كما وجد ان التركيز المولاري للقاعدتين (A) و (T) متساويان وكذلك فان (C = G) .

كما اتضح بان (A) تتحد مع القاعدة (T) بواسطة اصرتين من الاواصر الهيدروجينية اما القاعدة (G) فتتحد مع القاعدة (C) بثلاث اواصر هيدروجينية، كما وجد العلماء بان نسبة (G + C) الى نسبة (A + T) تكون ثابتة للنوع الواحد ومختلفة من نوع الى اخر . ان شكل الحلزون المزدوج والمكون من الجزيئات العملاقة والطويلة لـ DNA يكون على هيئة سلم او درج حيث يكون العمود الفقري لها من سلسلتين من وحدات السكر والفوسفات بصورة متبادلة اما درجات السلم الحلزوني فهي ازواج القواعد النتروجينية .

توجد (10) قواعد نتروجينية مزدوجة في كل لفة من لفات اللولب المزدوج وهذه القواعد تصطف على بعضها البعض وتكون المسافة بين الواحدة والاخرى هي 3.4 \AA وبذلك يكون طول اللفة (الدورة الواحدة) 34 \AA ويبلغ قطر الحلزون المزدوج حوالي 20 \AA ، ولكي يحصل الاستقرار الكيماوي لجزيئة الـ DNA يجب ان يكون اتجاه شريطي الـ DNA متعاكسين فالاول يكون باتجاه $3 \rightarrow 5$ والاخر يكون باتجاه $5 \rightarrow 3$.

وتختلف جزيئات الـ DNA في مقاومتها للحرارة اعتمادا على طبيعة القواعد النتروجينية الداخلة في تركيبها. اذ تكون الجزيئات الغنية بالـ G + C اكثر مقاومة للحرارة من تلك الغنية بالـ A + T ، وعندما تعرض الحلزون المزدوج الى درجة حرارة عالية بحدود 100 m° تتكسر جميع الاواصر الهيدروجينية التي تربط السلسلتين ويبتعد الخيطان المتكاملان عن بعضهما وتسمى هذه العملية مسخ الـ DNA، وبما ان الـ G ترتبط بالـ C بواسطة ثلاث اواصر هيدروجينية فان الحرارة اللازمة لفصل خيوط الـ DNA الغنية بالـ G + C تكون اعلى من تلك اللازمة لفصل خيوط الـ DNA الغنية بالـ A + T التي ترتبط بواسطة اصرتين هيدروجينية .

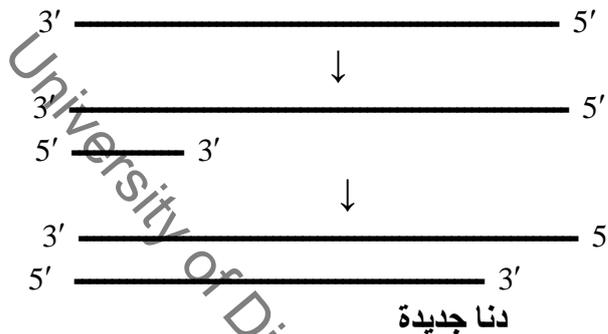
ويمكن اعادة ارتباط خيطي الحلزون الممسوخ كليا وذلك عن طريق التبريد البطيئ لمحلول الـ DNA الممسوخ، حيث تسمح هذه العملية بالتقاء الخيوط المفردة المتكاملة ثم ارتباطها معا عن طريق اعادة بناء الاواصر الهيدروجينية بين الازواج القاعدية لتكوين الحلزون المزدوج .

تكرار الـ DNA (تضاعف DNA) :

من اجل ان تقوم جزيئات الـ DNA بخزن ونقل المعلومات الوراثية بصورة آمنة، لابد ان تكون لها القدرة على التكرار والتضاعف بصورة دقيقة غير قابلة للخطأ بشكل يؤمن حصول الاجيال الناتجة على نفس الكمية والنوعية من المعلومات الوراثية الموجودة عند الاباء.

أوضح واطسن وكريك طريقة تكرار جزيئات الـ DNA والتي سميت بطريقة التكرار شبة المحافظ بناءا على حقيقة تكامل خيطي الحلزون حسب قاعدة الازواج القاعدي . وتفترض هذه الطريقة انفصال خيطي الحلزون عن بعضها في بداية عملية التكرار، حيث يستخدم كل خيط باعتبارها قالباً يخلق على اساسه خيط جديد مكمل حسب قاعدة الازدواج القاعدي لينتج عن ذلك حلزونان مماثلان للحلزون الاصلي يتكون كل منهما من خيط قديم واخر جديد، وبنفس الطريقة ينتج عن تكرار هذين الحلزونين اربعة حلزونات يتكون اثنان منهما من دنا جديدة في كلا الخيطين في حين تحتوي الحلزونات الباقية على خيط جديد واخر مصدره الحلزون الاصلي ، وهكذا تستمر عملية التكرار بحيث يتضاعف عدد الحلزونات المزدوجة (الكروموسومات) في كل دورة .

وتتم الية تكرار الـ DNA بوجود انزيم DNA Polymerase المسؤل عن تخليق خيوط الـ DNA الجديدة اثناء عملية التكرار شبة المحافظ من خلال اضافة النكليوتيدات الجديدة بصورة متعاقبة الى الخيط النامي ويتم ذلك حسب قاعدة الازدواج القاعدي باستخدام الخيط الابوي كقالب template في هذه العملية ، وتبدأ عملية التكرار بارتباط البادئ وهو عبارة عن قطعة DNA او RNA صغيرة مكملة لتتابع معين في القالب وذات نهاية 3 - OH حرة . يرتبط هذا البادئ مع الجزء المكمل له من القالب بعدها يبدأ انزيم DNA polymerase باضافة النكليوتيدات واحدة بعد الاخرى الى النهاية 3 - OH للبادئ وحسب قاعدة الازدواج القاعدي ، فاذا كانت القاعدة الموجودة في القالب هي A فان القاعدة المضافة للخيط الجديد ستكون T ، وستضاف C مقابل كل G ، وهكذا يستمر الانزيم باضافة النكليوتيدات واحدة بعد الاخرى الى النهاية 3 - OH مما يؤدي الى استطالة الخيط الجديد بالاتجاه 5 ← 3 .



تخليق الـ DNA بواسطة انزيم DNA polymerase

وقد اوضحت الدراسات التي اجريت على بكتريا E. coli وغيرها من الكائنات الحية ان تكرار الـ DNA داخل الخلايا عبارة عن عملية انزيمية معقدة يشترك فيها العديد من الانزيمات والعوامل المساعدة وتتم عملية التكرار بثلاث مراحل هي :

- 1- مرحلة بدا التكرار
- 2- مرحلة الاستطالة
- 3- مرحلة الاستئصال والربط

اذ يبدأ الكروموسوم الدائري (الحلقي) لبكتريا E. coli دائما من نقطة ثابتة تدعى منشأ التكرار حيث ينفك خيطا الحلزون في هذه النقطة ويبتعدان عن بعضهما وعندما يبدأ انزيم DNA polymerase بتخليق خيطين جديدين مكملين للخيطين الابويين ، وكلما استطال الخيطان الجديدان استمر انفصال خيطي الحلزون القديم عن بعضهما . وتدعى منطقة انفصال الخيطين الابويين شوكة التكرار . وتستمر استطالة الخيطين الجديدين في كلا الاتجاهين الى ان يصل الى نقطة على الكروموسوم مقابلة لمنشأ التكرار تسمى النهاية terminus التي ينفصل عندها الخيطان الابويان انفصالا تاما وتكمل عملية التكرار بتكوين حلزونين يتكون كل منهما من خيط جديد واخر قديم . تسمى عملية التكرار هذه التكرار ثنائي الاتجاه وذلك لحدوثه باتجاهين متعاكسين حيث يتم تخليق 50% من الـ DNA الجديدة في كل اتجاه .

هذا فيما يخص تكرار كروموسوم البكتريا ، أما في حالة الخلايا حقيقية النواة فأنها تمتلك أكثر من منشأ تكرار واحد في الكروموسوم ويعود السبب في ذلك الى كبر حجم كروموسوماتها مقارنة بكروموسوم البكتريا ، اذ يبدأ التكرار في المناشى المختلفة وتتم الأستطالة في كلا الأتجاهين الى أن تلتقي أجزاء الخيوط الجديدة مع بعضها لتكوين خيوط جديدة كاملة .

الاستئساخ والترجمة :

أن عملية تحويل المعلومات الوراثية المخزونة في أجين إلى بروتين فعال تسمى عملية تعبير الجين وتمر بمرحلتين أساسيتين هما الاستنساخ والترجمة، حيث تستنسخ المعلومات الوراثية الموجودة في الـ DNA إلى جزيئة رنا رسول (mRNA) ثم تقوم الرايبوسومات بترجمة هذه المعلومات المستنسخة لانتاج البروتين . كما تشمل هذه العملية عددا من عمليات التحويل على البروتين الناتج وذلك لاعطائه شكله النهائي الفعال.

1- الاستنساخ: Transcription

تبدأ هذه العملية بتباعد خيطي حلزون الدنا عن بعضهما، ثم يستخدم احدهما قالباً لتخليق جزيئة mRNA التي تنسلخ فيما بعد عن قالب الدنا لتقوم بنقل المعلومات الوراثية الى مواقع صنع البروتينات وهي الرايبوسومات التي تقوم بعملية الترجمة .

2- الترجمة: Translation

تشارك في عملية الترجمة ثلاث انواع من الحامض النووي RNA هي mRNA و rRNA و tRNA بالإضافة الى انواع مختلفة من الانزيمات والبروتينات التي تعمل معا لانتاج البروتين . فبعد اوصول المعلومات الوراثية بواسطة mRNA يعمل الرنا الرايبوسومي rRNA باعتباره منصة لتخليق السلسلة الببتيدية المتعددة في حين يقوم الرنا الناقل tRNA بالتفاعل مع الحوامض الامينية ليؤمن اضافتها بالشكل الصحيح الى سلسلة البروتين النامية . تترجم الرايبوسومات المعلومات الوراثية عن طريق قرائنها للشفرات الوراثية في جزيئة الرنا الرسول mRNA وتتكون كل شفرة من ثلاث نكليوتيدات تسمى كودون (Codon) تختص بحامض اميني معين، ويتم التعرف على الشفرة (الكودون) بواسطة ضد الشفرة (anticodon) الموجودة على جزيئة الرنا الناقل tRNA المرتبطة بحامض اميني معين . وهكذا كلما قرأ الرايبوسوم مشفر معين تقوم جزيئة الـ tRNA باضافة الحامض الاميني المناسب الى سلسلة الببتيد المتعدد .

الصفات العامة الاستنساخ :

الاستنساخ هو عملية تحويل المعلومات الوراثية المخزونة في الـ DNA الى معلومات وراثية مخزونة في جزيئة الرنا الرسول mRNA التي تقوم بنقل هذه المعلومات الى مواضع صنع البروتينات في الخلية، يقوم انزيم الاستنساخ RNA polymerase باستنساخ الجين الى جزيئة رنا رسول mRNA بعملية مشابهة لعملية تكرار الدنا DNA وذلك من خلال اضافته للنكليوتيدات الجديدة الى خيط الرنا الرسولي النامي، مستخدما احد خيطي الحلزون قالباً وحسب قاعدة الازدواج القاعدي، ولكن الاختلاف في هذه الحالة هو اضافة اليوراسيل (U) الى خيط الرنا الرسولي mRNA النامي بدلا عن الثايمين (T) كلما ظهر ادنين (A) في قالب الـ DNA، وباستثناء ذلك فان خيط الدنا يستنسخ بامانة تامة بواسطة انزيم بوليميريز الرنا RNA polymerase وتكون استطالة خيط mRNA بالاتجاه 5 ← 3 كما هو الحال عند تكرار الـ DNA . لذا تكون قطبية الرنا الرسولي mRNA الناتج مخالفة لقطبية قالب الـ DNA .

العلاقة بين الـ DNA والكروموسومات

اي كيفية انتظام الـ DNA ورزومه في الكروموسومات :

من المسائل التي واجهت علماء الوراثة والوراثة الخلوية هي كيفية انتظام جزيئة الـ DNA الطويلة جدا في الكروموسومات داخل الخلية . فبينما نجد ان طول الـ DNA كبيرا جدا نلاحظ بالمقابل ان حجم او طول الخلية النسبي هو اقل من طول الـ DNA بفارق كبير جدا وحتى لو اخذنا الفيروسات او البكتيريا فان المسألة تبدو معقدة جدا . فمثلا في خلية البكتيريا *E. Coli* يبلغ طولها (2nm) وقطرها (1nm) اما حلقة الـ DNA فيها فتبلغ (1360 nm) وهو ما يكفي للخلية بين (400 - 1000) مرة . وفي ذبابة الفاكهة (الدروسفلا) يبلغ طول الـ DNA (16000) نانوميتر وفي خلايا الانسان يكون طول

الـDNA في الكروموسومات داخل الخلايا اكثر من مليون ناتوميتر، بينما قطر خلايا معظم الكائنات الحية لايتجاوز بضع نايتوميترات. وعلى هذا الاساس فلايد من نظام معين يتم فيه رزم الـDNA في الكروموسومات داخل الخلايا .

ان عملية رزم الـDNA هي من المسائل المهمة في جميع الكائنات الحية (البدائية والراقية) لكنها تبدو اكثر حاجة للاحتكام والتنظيم في الكائنات الراقية (حقيقية النواة) منها في بدائية النواة . وبعد ان اتضح لنا مما سبق بان الـDNA يمكن النظر اليه بانه سلسلة طويلة مكونة من ازدواج النيكلوتيدات، الا ان الكروموسوم يمكن النظر اليه من حيث الحجم والتركييب البنائي على انه مكون من وحدات كروموسومية يطلق عليها اسم النيكلوسومات ترتبط مع بعضها بـ DNA الفاصل التي يمكن وصفها بحبات المسبحة. وهي تمثل الوحدات التركيبية المتكررة في الكروموسومات وتتالف من :

- 1- (146) جزيئة من النيكلوتيدات .
- 2- البروتينات القاعدية (الهستونات) وهي على خمسة انواع :
[H1, H2a, H2b, H3,H4]، ان الهستونات من النوع (H1) يقتصر وجودها على الـDNA الفاصل فقط اما الانواع الاربعة الاخرى فهي تشترك في تركيب النيكلوسومات . لقد اظهرت الدراسات ان كل نيكلوسوم يتالف من جزيئتين من كل من الهيستونات H4 H2a ,H2b H3,H2، أي ثمانية جزيئات وهي تمثل اللب وتحيط بها قطعة من الـDNA طولها (146) جزيئة من النيكلوتيدات تدور حول اللب الهيستوني حوالي دورتين . اما الـDNA الفاصل فيالف من (50 - 60) جزيئة من النيكلوتيدات تحيط بالهستون H1 . ولكون الهستونات القاعدية موجبة الشحنة والـDNA سالب الشحنة فان ارتباطها يتحقق عن طريق اواصر ايونية .

وعلى اية حالة يبدو ان الكروموسوم يتضمن جزيئة طويلة من الـDNA وليس جزيئات متعددة وعلى هذا الاساس فان الكروماتيد ما هو الا جزيئة واحدة طويلة مفردة من الحلزون المزدوج للـDNA وهي غير مقطعة، ملولبة ثم تعاد اللولبة لتكوين اللولبة الفائقة والتي تنطوي بدورها لتكوين الكروماتيد .
مستويات تنظيم الكروموسوم المختلفة :

- 1- الحلزون المزدوج للحامض DNA وهو مؤلف من ازدواج النيكلوتيدات .
- 2- الياف الكروماتين وهي ناتجة من اقتران الهستونات مع شريطي الـDNA لتكوين سلسلة من النيكلوسومات يفصل بعضها عن بعض الـDNA الفاصل ويبلغ قطر الليفة الكروماتينية حوالي (10) nm (أي نفس قطر جزيئة النيكلوسومات) .
- 3- النبيب Solinoid وهو ناتج من حلزنة الليف الكروماتيني بحيث يكون دورة كاملة في كل (سنة نكليوسومات) ويبلغ قطر النبيب (30) نانوميتر .
- 4- تحصل حالة حلزنة للنبيب ليكون الانبوب الاجوف Holow tube وقطره حوالي (200) nm .

5-الكروماتيد: يعاني الاجوف حلزنة اضافية وانطواءات اخرى لتكوين الكروماتيد وهو المستوى المميز للكروموسومات في الطور الاستوائي ويبلغ قطر الكروماتيد (600) nm.